



## **TEKNIikka JA LIIKENNE**

**Laboratorioala**

### **OPINNÄYTETYÖ**

#### **KVANTITATIIVISEN BIOANALYYTTISEN MENETELMÄN KEHITYS JA TESTAUS LÄÄKETUTKIMUKSESSA LC-MS/MS-LAITTEELLA**

**Työn tekijä: Kate Salomaa**  
**Työn ohjaajat: Jukka Niiranen**  
**Aira Heikkilä**

**Työ hyväksytty: \_\_\_\_ . \_\_\_\_ . 2010**

**Jukka Niiranen**  
**yliopettaja**



## **ALKULAUSE**

Tämä opinnäytetyö tehtiin Orion Pharma Oyj:n Espoon bioanalytiikan laboratoriolle. Sekä tämän opinnäytetyöprosessin että harjoittelun aikana saamani informaatio, apu ja tuki ovat olleet vertaansa vailla, ja haluan kiittää koko laboratorion henkilökuntaa ja erityisesti opinnäytetyön ohjaajaa, Group Manager Aira Heikkilää kaikista niistä hetkistä, jotka sain viettää kanssanne.

Espoossa 25.10.2010

Kate Salomaa

## TIIVISTELMÄ

<b>Työn tekijä:</b> Kate Salomaa	
<b>Työn nimi:</b> Kvantitatiivisen bioanalyttisen menetelmän kehitys ja testaus lääketutkimuksessa LC-MS/MS-laitteella	
<b>Päivämäärä:</b> 25.10.2010	<b>Sivumäärä:</b> 43 s.
<b>Koulutusohjelma:</b>  Laboratorioala	
<b>Työn ohjaaja:</b> FL Jukka Niiranen	
<b>Työn ohjaaja:</b> FM Aira Heikkilä	
<p>Tämä opinnäytetyö tehtiin Orion Pharman bioanalytiikan laboratoriossa Espoossa. Laboratorio on osa Orionin tutkimus- ja kehitysosastoa. Laboratoriossa kehitetään jatkuvasti uusia menetelmiä lääkekehityksen alkuvaiheen lääkeainekandidaateille sekä analysoidaan niiden pitoisuuksia erilaisista biologisista matriiseista.</p> <p>Työn tarkoituksena oli kehittää erälle lääkekehityksen alkuvaiheen molekyylille tietyt kriteerit täyttävä kvantitatiivinen analyysimenetelmä käyttäen HPLC-MS/MS-laitteistoa. Työssä käytettiin käänteisfaasikolonnia ja kolmoiskvadrupolimassa-analysaattoria. Tutkitavan analyytin kvantitoinnissa käytettiin ulkoisen standardin menetelmää.</p> <p>Menetelmänkehitys kokonaisuudessaan käsitti näytteenkäsittelytekniikan kehityksen hiiren plasmamatriisille ja nestekromatografian ajo-olosuhteiden sekä massa-analysaattorin asetusten optimoinnin. Menetelmän toimivuutta arvioitiin Orionin sisäisen SOP (Standard Operation Procedure) -toimintaohjeen avulla. Testatut parametrit olivat spesifisyys ja selektiivisyys, kalibrointi, carry over, menetelmän oikeellisuus ja toistettavuus, määritysalara ja analyytin säilyvyys. Työssä tutkittiin SOP-toimintaohjeesta poiketen myös saanto ja matriisiefekti.</p> <p>Menetelmä toimi halutulla tavalla ja täytti kaikki sille asetetut vaatimukset. Analyytin säilyvyystutkimuksissa havaittiin sen säilyvän loppuluottimessa mutta ei asetoniitriliin valmistetuissa kantaliuoksissa. Analyytin saanto oli noin 90 prosenttia riippumatta sen pitoisuudesta. Matriisiefektiä tutkittaessa havaittiin jonkin hiiren plasmasta peräisin olevan komponentin aiheuttavan matriisiefektiä tutkitavan analyytin retentioajalla, mutta menetelmän toimivuuteen tai toistettavuuteen sen ei havaittu vaikuttavan.</p> <p>Menetelmä on tällä hetkellä käytössä Orionin bioanalytiikan laboratoriossa. Analyytin säilyvyystutkimuksissa on havaittu, että se hapettuu asetoniitrilissä. Menetelmää on tästä syystä edelleen kehitetty siten, että myös analyytin hapettumistuotetta mitataan kalibrointistandardeista, QC-näytteistä sekä tutkimusnäytteistä. Tutkitavan analyytin on havaittu säilyvän metanolissa.</p>	
<b>Avainsanat:</b> bioanalytiikka, LC-MS/MS, menetelmänkehitys, neste-neste-uutto, sähkösumutusionisaatio	

## ABSTRACT

<b>Name:</b> Kate Salomaa	
<b>Title:</b> Development and Testing of Quantitative LC-MS/MS Method in Drug Research	
<b>Date:</b> 25 November 2010	<b>Number of pages:</b> 43
<b>Department:</b> Laboratory Sciences	
<b>Instructor:</b> Jukka Niiranen, LPh	
<b>Supervisor:</b> Aira Heikkilä, M.Sc.	
<p>This graduate study was carried out for Orion Pharma's bioanalytical laboratory at Espoo. The bioanalytical laboratory is a part of the research and development department of Orion Pharma. For drug candidates at discovery phase, new methods are continuously developed and their concentrations are analysed from different biological matrices in the bioanalytical laboratory.</p> <p>The purpose of this study was to develop quantitative method for one drug candidate in discovery phase that fulfills certain requirements using HPLC-MS/MS-equipment. The study was carried out using reverse phase column and triple quadrupole mass analyser. The quantification was implemented using external calibration.</p> <p>The study consisted of the development of pre-treatment process for plasma sample and the optimization of run conditions for HPLC and parameters of the mass analyser. The functionality of method was evaluated with Orion's closed circuit Standard Operation Procedure. The parameters tested were specificity and selectivity, calibration, carry over, the accuracy and the repeatability of the method, the lower limit of quantification and the stability of the analyte. In addition to Standard Operation Procedure, also recovery and matrix effect were tested.</p> <p>Method worked as expected and filled all the set criteria. The analyte was stable in final solution but not in acetonitrile stock solution. The recovery of the analyte was approximately 90 % regardless of concentration of the analyte. There occurred a matrix effect at the analyte's retention time, which was probably caused by some component in used plasma. It did not influence the operation or repeatability of the method.</p> <p>The developed method is in use at the bioanalytical laboratory of Orion. In studies regarding the stability of the analyte it has been noticed that the analyte oxidises in acetonitrile. Therefore, the method has been perfected in a way that the oxidation product of analyte is also detected in calibration standards, QC-samples and research samples. In more exact examinations, it has been discovered that the analyte is stable in methanol.</p>	
<b>Keywords:</b> bionalytics, electrospray ionisation, LC-MS/MS, liquid-liquid extraction, method development,	

# SISÄLLYS

## ALKULAUSE

## TIIVISTELMÄ

## ABSTRACT

<b>1</b>	<b>JOHDANTO</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>NESTE-NESTE-UUTTO</b>	<b>2</b>
2.1	Uuttumiseen vaikuttavat tekijät	2
2.1.1	<i>pH sekä yhdisteen rakenne</i>	2
2.1.2	<i>Uuttoliuotin</i>	3
2.2	Uuttoprosessi	4
2.3	Liuottimen haihdutus ja analyytin konsentrointi	5
<b>3</b>	<b>TYÖSSÄ KÄYTETTY ANALYYSITEKNIikka</b>	<b>5</b>
3.1	HPLC	5
3.1.1	<i>Kolonne ja kolonniuuni</i>	6
3.1.2	<i>Käänteisfaasikromatografia</i>	6
3.2	Massaspektrometria	8
3.2.1	<i>Sähkösumutusionisaatio (ESI)</i>	8
3.2.2	<i>Ionisaatioon vaikuttavat tekijät</i>	9
3.2.3	<i>Tandemmassaspektrometrin kvadrupolit ja toimintaperiaate</i>	11
3.2.4	<i>Ionien seurantatavat</i>	12
<b>4</b>	<b>MENETELMÄN KEHITYS</b>	<b>13</b>
4.1	Laitteisto	13
4.2	Reagenssit ja välineet	14
4.3	Massaspektrometrin optimointi	14
4.4	Nestekromatografian ajo-olosuhteiden optimointi	16
4.5	Uuttoliuotinvertailut neutraalissa ja emäksisessä pH:ssa	23

<b>5</b>	<b>MENETELMÄN TESTAUS</b>	<b>26</b>
<b>5.1</b>	<b>Näytteiden valmistus ja käsittely</b>	<b>27</b>
5.1.1	<i>Kalibrointistandardien ja QC-näytteiden valmistus</i>	27
5.1.2	<i>Saantokoe- ja saantovertailunäytteiden valmistus</i>	28
5.1.3	<i>Näytteenkäsittely</i>	29
<b>5.2</b>	<b>Testatut parametrit</b>	<b>29</b>
5.2.1	<i>Spesifisyys ja selektiivisyys</i>	29
5.2.2	<i>Kalibroinnin lineaarisuus, oikeellisuus ja toistettavuus</i>	30
5.2.3	<i>Carry over</i>	34
5.2.4	<i>Määrityssalaraja</i>	35
5.2.5	<i>Menetelmän oikeellisuus ja toistettavuus</i>	36
5.2.6	<i>Analyytin säilyvyys</i>	38
5.2.7	<i>Saanto</i>	39
5.2.8	<i>Matriisiefekti</i>	40
<b>6</b>	<b>YHTEENVETO JA LOPPUPÄÄTELMÄT</b>	<b>41</b>
	<b>VIITELUETTELO</b>	<b>43</b>

## 1 JOHDANTO

Kvantitatiivisen bioanalyttisen menetelmän kehitys voi olla hyvinkin haastavaa riippuen siitä, mitä näytteenkäsittelytekniikkaa käytetään ja millaisessa matriisissa tutkittava analyytti on. Näytteenkäsittelyn tarkoituksena on puhdistaa ja usein myös konsentroida näyte, jotta sen pitoisuus voidaan määrittää. Mikäli näytematriisi on esimerkiksi plasmaa, seerumia, virtsaa, sylkeä tai kudoksia, menetelmää kutsutaan bioanalyttiseksi näytteenkäsittelytekniikaksi. Oikeanlaisen näytteenkäsittelymenetelmän valitseminen on analyysin kannalta erittäin tärkeää, sillä se vaikuttaa näytteen puhtauteen ja tätä kautta koko analyysiin. Lääkeaineiden pitoisuuksien määrittäminen on tärkeä osa lääkeaineen discovery- ja kehitysvaihetta, jolloin saadaan paljon tärkeää tietoa lääkeaineen vaikutuksesta ja farmakokinetikasta sekä eläimillä että ihmisillä. [1, s. 41.]

Luotettava analyttinen menetelmä koostuu tehokkaasta näytteenkäsittelystä, tarkoitukseen sopivasta kromatografisesta erotuksesta sekä herkästä detektitekniikasta. Nestekromatografian ja massaspektrometrin yhdistelmä on suosittu analyttinen tekniikka erityisesti lääkeaineanalytiikassa. Tandemmassaspektrometrillä voidaan identifioida spesifinen äiti-tytär-ionipari, jolloin lääkeaineen pitoisuus voidaan määrittää myös biologisesta matriisista. LC-MS/MS-tekniikka on laajalti käytetty, sillä sen nopeus, herkkyys, spesifisyys, tarkkuus ja laaja detektointialue ovat omaa luokkaansa. [1, s. 41–42.]

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena on kehittää Orion Pharman bioanalytiikan laboratorion käyttöön kvantitatiivinen LC-MS/MS-menetelmä, jolla voidaan luotettavasti ja toistettavasti määrittää erään discovery-vaiheen lääkeainekandidaatin pitoisuuksia hiiren plasmasta. Työhön sisältyy myös näytteenkäsittelymenetelmän kehitys.

Opinnäytetyö koostuu pääpiirteittäin kolmesta kokonaisuudesta. Teoriaosiossa käsitellään työn käytännön kannalta oleellisia asioita, joita ovat näytteenkäsittely sekä työssä käytetty analyysitekniikka. Menetelmänkehitysosiossa kuvataan näytteenkäsittelytekniikan kehitys sekä nestekromatografian ajolosuhteiden ja kvadrupolimassaspektrometrin asetusten optimointi. Menetelmän testausosiossa esitellään Orion Pharman sisäisen SOP-toimintaohjeen edellyttämät testattavat parametrit, joita ovat spesifisyys ja

selektiivisyys, kalibrointi, carry over, menetelmän oikeellisuus ja toistettavuus, määrittysalaraja, analyytin säilyvyys. Edellä mainittujen testattavien asioiden lisäksi määritetään analyytille saanto sekä tutkitaan mahdollisen matriisiefektin ilmenemistä.

## 2 NESTE-NESTE-UUTTO

Neste-neste-uutoksi kutsutaan menetelmää, jonka tarkoituksena on eristää suurin osa tutkittavaa analyyttiä näytematriisista. Uutossa on kaksi faasia, vesifaasi ja orgaaninen faasi, jotka eivät sekoitu keskenään. Analyytin uutuminen orgaaniseen faasiin perustuu sen jakaantumismvakioon ja kemialliseen olomuotoon. Jakaantumismvakio kuvaa analyytin tasapainoa kahden toisiinsa liukenemattoman faasin välillä. Analyytti saadaan siirtymään vesifaasista orgaaniseen faasiin silloin, kun se on varauksettomassa muodossa ja liukenee käytettävään orgaaniseen uuttoluottimeen. [1, s. 277–279.]

Neste-neste-uuttoa on paljon käytetty näytteen esikäsittelymenetelmänä lääkeaineanalytiikassa sen edullisuuden ja tehokkuuden vuoksi [1, s. 48]. Menetelmän kehitys on useimmiten nopea, mistä on etua erityisesti farmaseuttisissa laboratorioissa [1, s. 280].

### 2.1 Uuttumiseen vaikuttavat tekijät

Analyytin uuttumiseen vesifaasista orgaaniseen faasiin vaikuttaa pääasiassa kaksi asiaa. Toinen niistä on näytteen pH ja toinen on orgaanisen liuottimen luonne. Yhdisteet uuttuvat orgaaniseen liuottimeen parhaiten silloin, kun ne ovat neutraalissa muodossa. Ideaalitilanteessa myös analyysiä mahdollisesti häiritsevät komponentit, kuten epäorgaaniset suolat, proteiinit ja vesiliukoiset epäpuhtaudet jäävät vesifaasiin. Uutettavat analyytit eivät tavallisesti vaadi voimakasta puskurointia pysyäkseen neutraaleina.

[1, s. 48, 307–308.]

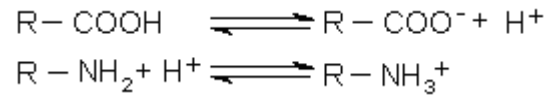
#### 2.1.1 pH sekä yhdisteen rakenne

Uuttumisen ymmärtämisessä on oltava tietoinen käytettävän uuttoluottimen fysikaalisista ja kemiallisista ominaisuuksista sekä uutettavan yhdisteen sisältämistä funktionaalisista ryhmistä, sillä yhdisteen uuttumiseen vaikuttaa olennaisesti se, missä muodossa se on. Lääkeaineet sisältävät funktionaalisia ryhmiä, jotka ovat yleensä heikkoja happoja tai emäksiä, ja sisältävät ta-



vallisesti karboksyyli- tai amiiniryhmiä. Heikot hapot ja emäkset voivat olla emäs- tai happomuodossa liuoksen pH:sta riippuen. [1, s. 55.]

Kuvassa 1 on esitetty heikon hapon sekä heikon emäksen tasapainoreaktiot.



*Kuva 1. Heikon hapon ja emäksen tasapainoreaktiot [1 s. 55]*

Mikäli yhdiste on hapan, se on neutraalissa muodossa silloin, kun pH on pienempi kuin yhdisteen pKa-arvo. Happaman yhdisteen pH tulisi säätää vähintään kaksi pH-yksikköä alhaisemmaksi kuin uutettavan yhdisteen pKa-arvo. Yhdisteen ollessa emäksinen, tulisi pH säätää mieluiten noin kaksi pH-yksikköä korkeammaksi kuin yhdisteen pKa-arvo. Tällöin yli 99 % yhdisteestä on neutraalissa muodossa. [1, s. 308, 57.]

Usein tilanne on kuitenkin se, ettei lääkeainekandidaatin pKa-arvoa tiedetä. Tällöin se on pyrittävä ennustamaan. Mikäli yhdiste sisältää amiiniryhmän, on pKa-arvo tavallisesti välillä 8.0–10.0. Tällöin pH tulisi säätää mieluiten välille 10.0–13.0. Happojen tyypilliset pKa-arvot ovat välillä 3.0–5.0, jolloin pH tulisi vastaavasti säätää välille 1.0–3.0. Halogeeniryhmät vaikuttavat myös yhdisteen pKa-arvoon siten, että mitä lähempänä ne ovat funktionaalista ryhmää, esimerkiksi karboksyylihapporyhmää, sitä pienempi on yhdisteen pKa-arvo. Myös yhdisteen rakenne vaikuttaa sen pKa-arvoon olennaisesti, jolloin esimerkiksi aromaattisten happojen pKa-arvot ovat pienempiä kuin alifaattisten happojen. Menetelmänkehityksessä näyte voidaan myös uuttaa liuoksilla, joiden pH-arvot ovat erilaisia, jolloin yhdisteen pKa-arvo voidaan arvioida uuttosaannon perusteella. [1, s. 59.]

### 2.1.2 Uttoliuotin

Tärkeitä uuttoliuottimen ominaisuuksia neste-neste-uuton kannalta ovat polaarisuus, haihtuvuus, selektiivisyys uutossa analyytin suhteen sekä tiheys. Uttoliuotin ei saa liueta veteen eikä aiheuttaa terveysongelmia laboratorioissa työskentelevälle henkilökunnalle. Lisäksi sen tulee haihtua kohtuullisessa ajassa ja olla edullinen. [1, s. 311–313.]

Neste-neste-uutossa käytettävät orgaaniset liuottimet vaihtelevat erityisesti polaarisuutensa suhteen. Myös tutkittavan analyytin liukoisuus erilaisiin liuot-

timiin vaihtelee, minkä vuoksi optimaalisin vaihtoehto voidaan löytää esimerkiksi saantokokeiden avulla. [1, s. 311.]

Polaarisuusindeksin avulla voidaan ennustaa liuottimen uuttotehokkuus, johon vaikuttavat tutkittavassa analyytissä olevat poolittomat tai pooliset funktionaaliset ryhmät. Liuottimen haihtuvuus on myös erittäin tärkeä tekijä sopivaa uuttoliuotinta valittaessa, sillä sen haihtumiseen kuluva aika ei saa analyysin kustannusten takia olla kovin pitkä. Uuttoliuottimet eivät saa päästä laboratorion huoneilmaan, minkä vuoksi uuttoprosessi on aina suoritettava esimerkiksi vetokaapissa. [1, s. 312–313.]

Mitä enemmän uuttoliuotin liukenee veteen, sitä enemmän se todennäköisesti uuttaa näytematriisista analyysiä mahdollisesti häiritseviä komponentteja. Nämä näytematriisista peräisin olevat komponentit voivat aiheuttaa matriisiefektiä, joka havaitaan massaspektrometrin signaalin vahvistumisena tai heikkenemisenä. Tämän vuoksi on siis valittava uuttoliuotin, joka aiheuttaa mahdollisimman vähän matriisiefektiä, mutta on kuitenkin riittävän selektiivinen uutettavalle analyytille. Neste-neste-uutossa käytetään usein kahden tai useamman liuottimen seoksia erityisesti silloin, kun näytematriisissa on useampia erilaisia funktionaalisia ryhmiä sisältäviä yhdisteitä.

[1, s. 313–314.]

Orgaanisen liuottimen tiheys on tärkeä ominaisuus. Vettä kevyemmät liuottimet jäävät koeputken pinnalle ja vettä raskaammat painuvat koeputken pohjalle uuttoprosessin päätteeksi. Useimmiten suositaan vettä kevyempiä orgaanisia liuottimia, koska kerrosten erottaminen on helpompaa ja tehokkaampaa. Vesikerros jää tällöin nopeasti jäädytettäessä koeputken pohjalle, minkä jälkeen orgaaninen uuttoliuotin dekantoidaan uuteen koeputkeen ja haihdutetaan. [1, s. 315.]

## **2.2 Uuttoprosessi**

Neste-neste-uutossa tarvitaan koeputkia, jotka ovat tavallisesti borosilikaattilasialasia. Lisäksi tarvitaan pipettejä ja automaattiannostelija, jolla jokaiseen koeputkeen voidaan annostella toistettava määrä uuttoliuotinta. Koska näyteputkia saattaa olla useita kymmeniä, on hyvä käyttää vorteksointiyksikköä, jolla kaikki näyteputket voidaan vorteksoida samalla kertaa. [1, s. 281.]

Suhteellisen voimakas sekoitus laajentaa orgaanisen nesteen pintaa ja nopeuttaa uuttumisprosessia. Mitä suurempi uuttoliuottimen tilavuus on suhteessa liuokseen, josta analyytti halutaan eristää, sitä tehokkaampaa uuttuminen on ja sitä suurempi saanto analyylille saadaan. Uuttoliuotin voi olla esimerkiksi heksaani, etyyliasettaatti, dietyylieetteri tai näiden sekoitus. Faasit erotetaan tavallisesti sentrifugauksella, jonka optimiaika on yleensä noin kymmenen minuuttia nopeudella 2000–3000 rpm (rounds per minute). [1, s. 277–279, 281.]

### **2.3 Liuottimen haihdutus ja analyytin konsentrointi**

Näyte, joka on orgaanisessa uuttoliuotimessa, ei sellaisenaan sovi injektoitavaksi nestekromatografialaitteistoon. Näytematriisi sisältää muun muassa proteiineja ja suoloja, jotka voivat injektoituina laitteistoon aiheuttaa esimerkiksi tukkeumia laitteistossa, äkillistä paineen nousua, proteiinien tarttumista kolonnin pintaan tai massaspektrometrin likaantumista. Tällöin sen suorituskyky olennaisesti heikkenee. [1, s. 43.]

Neste-neste-uuton liuotin tavallisesti haihdutetaan esimerkiksi typhen avulla Turbo Vap<sup>TM</sup> -laitteessa, johon mahtuu useita kymmeniä koeputkia kerrallaan. Tämän jälkeen tilalle lisätään näyteliuotinta, joka on samanlainen tai samantyyppinen kuin nestekromatografissa käytettävä ajoliuos. Koska kuivaan putkeen lisättävän näyteliuottimen tilavuus on paljon pienempi verrattuna uuttoliuottimen määrään, näyte konsentroituu samalla. [1, s. 43, 127.]

## **3 TYÖSSÄ KÄYTETTY ANALYYSITEKNIikka**

Työssä käytettiin korkean erotuskyvyn käänteisfaasinestekromatografiaa. Yhdiste ionisoitiin sähkösumutusionisaatiota käyttäen (ESI) ja detektoitiin kolmoiskvadrupolimassa-analysaattorilla (MS/MS). Seuraavissa kappaleissa on esitelty kyseisten analyysimenetelmien teoria.

### **3.1 HPLC**

Korkean erotuskyvyn nestekromatografiaa (HPLC) käytetään sekä orgaanisten että epäorgaanisten yhdisteiden analytiikassa. HPLC-tekniikalla voidaan analysoida monia suurikokoisiakin molekyylejä samanaikaisesti. Tällaisia ovat esimerkiksi suuret biologiset molekyylit ja jotkut lääkeaineet. Edellytys

analyysille on, että tutkittava analyyyti saadaan liukenemaan johonkin liuottimeen. [2, s. 153.]

Nestekromatografialaitteisto koostuu injektorista, pumpusta, kolonnista, detektorista, kapillaareista sekä tiedonkeruu- ja tulostusyksiköstä. Laitteistoon syötettävä näytemäärä on tavallisesti muutamia kymmeniä mikrolitroja, ja se syötetään laitteistoon, jonka sisällä, hyvin ohuissa kapillaareissa virtaa liikkuva faasi. Näyte virtaa liikkuvan faasin mukana kolonniin, jossa yhdisteiden varsinainen erottuminen tapahtuu. Mitä pienempiä kolonnin partikkelit ovat, eli mitä suurempi kokonaispinta-ala kolonnissa on, sitä tehokkaampaa yhdisteiden erottuminen on. Laitteiston pumppujen tulee kyetä pumppaamaan ajoliuosta korkeaa painetta vastaan sykkeettömästi. Erottumisen aikana näyte jakautuu kolonnissa komponenteikseen siten, että detektorilla havaitaan ensin yhdisteet, joiden tasapaino on liikkuvan faasin puolella. Tätä vastoin molekyylit, joiden tasapaino on kolonnin stationäärifaasin puolella, eluoituvat kolonnista myöhemmin. Kun eri komponenttien tuottamaa signaalia seurataan ajan funktiona, saadaan tuotettua kromatogrammi. [2, s. 154; 3, s. 1.]

### *3.1.1 Kolonni ja kolonniuuni*

Kolonnilla on analyysissä erityinen tehtävä, sillä se erottaa jo pienet määrät analyyyttiä paljon suuremmasta määrästä näytematriisia. Kolonni on tavallisesti 3 - 30 cm pitkä, halkaisijaltaan 2 - 8 mm oleva teräsputki. Kolonnin sisällä on stationäärifaasi, joka voi olla esimerkiksi silikaan sidottu tietyn pituinen hiilivetyketju. Kolonnissa käytetään usein helposti puhdistettavissa tai vaihdettavissa olevaa esikolonnia, joka on pakattu samanlaisella tai -kaltaisella materiaalilla kuin kolonni. Esikolonnin tehtävänä on poistaa näytteen kiinteät analyysiä häiritsevät partikkelit, jolloin varsinaisen kolonnin suorituskyky paranee ja käyttöikä pitenee. [1, s. 42; 2, s. 156; 4, s. 5.]

Kolonniuunin avulla voidaan kolonnin lämpötilaa kontrolloida, mikä parantaa analyysin toistettavuutta. Lämpötilalla voidaan vaikuttaa sekä yhdisteiden etä ajoliuoksen käyttäytymiseen ja keskinäisiin vuorovaikutuksiin, jolloin voidaan vaikuttaa esimerkiksi yhdisteiden retentioaikoihin, ionisoitumiseen ja tätä kautta myös niistä saatavan signaalin suuruuteen. [4, s. 5.]

### *3.1.2 Käänteisfaasikromatografia*

Käänteisfaasikromatografia on käytetyin HPLC-menetelmä, koska sillä saadaan hyvin eroteltua näytteiden sisältämät yhdisteet toisistaan ja siinä käyte-

tyt ajoliuokset soveltuvat massadetektorin ionisaatioon. Käänteisfaasikromatografiassa stationäärifaasin pinta on pooliton ja ajoliuos poolinen, tavallisesti veden ja jonkin vähemmän poolisen orgaanisen liuottimen (asetonitrili, metanoli) yhdistelmä. Analyytin pidäytyminen perustuu sen hydrofobisuuteen, jolloin ajoliuoksen poolisuuden ja analyytin alifaattisen ketjun pituuden kasvaessa sen retentioaika kasvaa. [5, s. 35.]

Käänteisfaasikromatografiassa stationäärifaasi on useimmiten silikapohjainen, ja siihen on kovalenttisesti liitetty hiilivetyketjuja. Kaikkiin silanoryhmiin ei kuitenkaan ole mahdollista liittää hiilivetyketjua, jolloin osa silanoryhmistä on vapaina. Mitä korkeampi ajoliuoksen pH on, sitä useampi vapaa silanoryhmä on negatiivisesti varautunut. Tästä johtuen kationiset analyytit pidätyvät voimakkaasti stationäärifaasiin ja niiden kohdalla esiintyy usein piikkien häntimistä. Ilmiö on pyritty estämään endcapping-tekniikalla, jossa vapaat silanoryhmät on suljettu esimerkiksi polaarisen ryhmän sisältävillä lyhyillä hiilivetyketjuilla. [5, s. 36–38.]

Monoliittikolonnit koostuvat huokoisesta kappaleesta, joka voi olla valmistettu polymeeristä tai silikasta. Erikokoiset huokokset muodostavat kanavamaisen verkoston. Pienemmät huokokset laajentavat kolonnin sisäpintaa, mikä on välttämätöntä riittävän erottumisen saavuttamiseksi. Isompien huokosten tehtävä on vähentää suuren virtausnopeuden aiheuttamaa vastapainetta. Analyyttien erottuminen moniliittikolonneilla perustuu sekä niiden kokoon että vuorovaikutuksiin stationäärifaasin kanssa. Suuret molekyylit eluoituvat nopeasti, sillä ne eivät mahdu stationäärifaasin pieniin huokosiin. Pienet molekyylit tätä vastoin jäävät tilapäisesti huokosten sisään, jolloin niiden eluotuminen kolonnista kestää kauemmin. Monoliittikolonnien avulla voidaan saavuttaa suuri erotustehokkuus suurilla virtausnopeuksilla, koska erotustehokkuuden riippuvuus virtausnopeudesta on hyvin pieni.

[1, s. 519; 2, s. 159; 6, s. 172.]

Nestekromatografian ja massaspektrometrin yhteensovittamisen vaatimuksena on, että nestekromatografissa erotettu analyytti voidaan siirtää normaali-paineisesta nestefaasista kaasufaasiin ja edelleen massa-analysaattoriin, jossa vallitsee hyvin pieni paine. Mikäli yhdiste halutaan detektoida kolmoiskvadrupolimassa-analysaattorilla, voidaan yhdisteet ionisoida esimerkiksi ilmanpaineisella kemiallisella ionisaatiolla (APCI) tai sähkösumutusionisaatiolla (ESI).

## 3.2 Massaspektrometria

Massaspektrometrissä tutkittava yhdiste ionisoidaan molekyyli-ioniksi, jolla on ylimääräistä energiaa. Molekyyliä voidaan ionisoida esimerkiksi pommitamalla niitä elektroneilla tai neutraaleilla atomeilla, jolloin molekyylin sidokset katkeavat ja molekyyli-ioni pilkkoutuu pienemmiksi kappaleiksi. Laite havaitsee vain negatiiviset tai positiiviset ionit, joten sillä ei voida analysoida neutraaleja fragmentteja. Massaspektrometri erottelee syntyneet fragmentit toisistaan niiden massa-varaussuhteen ( $m/z$ ) mukaan. Massaspektri kuvaa molekyylin rakennetta, joten sen pohjalta yhdiste voidaan tunnistaa.

[2, s. 122.]

Tyypillisesti massaspektrometri on liitetty kromatografiin, joka erottelee yhdisteet, ja näin ne voidaan analysoida puhtaina yhdisteinä massaspektrometrillä [2, s. 122]. Lisää selektiivisyyttä ja herkkyyttä detektioon saadaan tandemmassatekniikalla, jossa vähintään kaksi MS-analysaattoria liitetään peräkkäin [6, s. 116].

### 3.2.1 Sähkösumutus-ionisaatio (ESI)

Sähkösumutus-ionisaatio on ilmanpaineessa tapahtuva pehmeä ionisointitekniikka, jolla fragmentoituminen on vähäistä ja jolla voidaan analysoida heikkosidoksia yhdisteitä. Tekniikalla tuotetaan kaasumuodossa olevia joko positiivisesti tai negatiivisesti varattuja ioneja, jotka analysoidaan massa-analysaattorissa. Nestefaasissa olevat ionimuodossa olevat molekyylit kulkevat nestekromatografista välikammioon, pienen ontton kapillaarin kautta, jossa on suuri jännite (2–5 kV). Mikäli analysoidaan positiivisia ioneja, kapillaarin jännite on positiivinen. Tällöin negatiiviset ionit karsiutuvat pois ajautuen kapillaarin seinämille ja positiiviset ionit kulkeutuvat eluentin pinnalle. Tämän seurauksena kapillaarin päähän muodostuu kartion muotoinen suihku (Taylorin kartio). Eluentista irtoaa positiivisesti varautuneita pisaroita. Kun pisarasta haihtuu esimerkiksi typpikaasun ansiosta liuotinta, pisaran pinnalla varaustiheys kasvaa. Kun positiivisten ionien toisiinsa kohdistuva poistovoima kasvaa pisaran pintajännitystä suuremmaksi, pisara hajoaa pienemmiksi pisaroiksi. Sama ilmiö toistuu niin monta kertaa, että jäljellä on yksittäinen kaasumuodossa oleva positiivisesti varautunut ioni. Muodostuneet ionit kerätään massaspektrometriin. [2, s. 211–212; 6, s. 71–73.]

Positiivisessa ESI-ionisaatiossa pieniä emäksisiä yhdisteitä analysoitaessa muodostuu tavallisesti protonoituneita molekyylejä ( $[M+H]^+$ ), mutta spektreissä saattaa esiintyä myös addukti-ioneja, esimerkiksi  $[M+Na]^+$  ja  $[M+NH_4]^+$ . Happamien yhdisteiden kohdalla muodostuvat molekyylit ovat useimmiten deprotonoituneita ( $[M-H]^-$ ). Myös happamia yhdisteitä analysoitaessa voi muodostua addukti-ioneja, esimerkiksi  $[M+HCOO]^-$  ja  $[M+CH_3COO]^-$ . [6, s. 74.]

Sähkösumutusionisaatio saattaa tuottaa myös monivarauksellisia ioneja, mikä mahdollistaa myös esimerkiksi suolojen tai makromolekyylien kvantitatiivisen analysoinnin. Mitä suurempi on tutkittavan molekyylin moolimassa, sitä monivarauksellisempi se todennäköisesti on. [6, s. 75; 7, s. 68–69.]

### 3.2.2 Ionisaatioon vaikuttavat tekijät

Ionisaatioon vaikuttavat analyytin ja käytettävän liuottimen kemialliset ominaisuudet sekä ionisaatiolähteen fysikaaliset tekijät. Myös käytettävän eluointipuskuriliuoksen konsentraatio ja ominaisuudet on otettava huomioon. Analyytin osalta tärkeitä tekijöitä ovat mm. sen poolisuus, konsentraatio sekä moolimassa ja liuottimen osalta sen johtokyky, pintajännitys sekä haihtuvuus. Ionisaatiolähteen fysikaalisilla ominaisuuksilla tarkoitetaan esimerkiksi kapillaarin jännitettä ja lämpötilaa. [6, s. 75.]

Analyytin poolisuus vaikuttaa siitä saatavaan vasteeseen siten, että esimerkiksi hydrofobisten happaman tai emäksisen ryhmän sisältävien analyyttien herkkyys on useimmiten hyvä. Pienillä pitoisuuksilla signaali kasvaa lineaarisesti pitoisuuden kasvaessa, mutta tietyssä vaiheessa signaalin lineaarinen kasvu lakkaa. Tämä johtuu siitä, että pisaran muodostuessa sen ulkopinta on kyllästynyt analyytti-ioneista, jolloin ylimääräiset analyytti-ionit joutuvat pisaran sisälle. Tämän seurauksena niiden kaasufaasiin siirtymisen tehokkuus pienenee. [6, s. 76–77.]

Varautuneen aerosolin muodostumisen edellytys on, että käytettävän liuottimen sähkönjohtokyky on riittävän suuri. Tällöin kapillaarin kärjessä olevan elektrostaattisen kentän vaikutus eluenttiin on halutunlainen ja vastavarauksiset ionit saadaan siirrettyä kapillaarin seinämille. Sähkösumutukseen parhaiten sopivat liuottimet ovat keskipoolisia tai poolisia, kuten esimerkiksi asetonitriili ja vesi. Käytettävän liuottimen pintajännitys ei saisi olla liian suuri, sillä tällöin ionisaatiossa muodostuu isoja alkupisaroita, joiden hajoaminen

pienemmiksi pisaroiksi kestää kauemmin ja samalla ionien kaasufaasiin tuottaminen vähenee. Mitä haihtuvampi liuotin on, sitä nopeampaa on pisaroiden jakaantuminen pienemmiksi pisaroiksi. Sähkösumutusionisaatiossa voidaan saavuttaa hyvä herkkyys käyttämällä liuottimia, joilla on alhainen pintajännitys ja kiehumispiste. Vesipohjaisia eluenteja käytettäessä voidaan ionisaatiotehokkuutta lisätä käyttämällä lämmitystä sekä sumutuskaasua.

[6, s. 75.]

Kapillaarin jännitteen täytyy olla riittävän suuri ja sen etäisyyden ionisaatiolähteeseen riittävän pieni, jotta ionisaatio olisi riittävän tehokasta. Kapillaarin kärjen säätäminen liian lähelle ionisaatiolähdettä saattaa kuitenkin aiheuttaa varauksenpurkauksen, jonka vaikutuksesta laitteiston herkkyys ja stabiiliisuus saattavat romahtaa. Tällöin on myös vaara, että laitteisto menee oikosulkuun ja massaspektrometrin elektroniikka vaurioituu.

[6, s. 77.]

Sähkösumutusionisaatiossa voidaan käyttää vain haihtuvia puskureita, kuten esimerkiksi ammoniumformaattia tai ammoniumasetaattia. Haihtumattomien yhdisteiden käyttö voi liata ionilähteen, jolloin laitteiston herkkyys huononee. Puskurikonsentraation tulisi lisäksi olla alhainen, sillä liian vahvat puskurikonsentraatiot estävät analyytin ionien tehokkaasti kaasufaasiin siirtymisen.

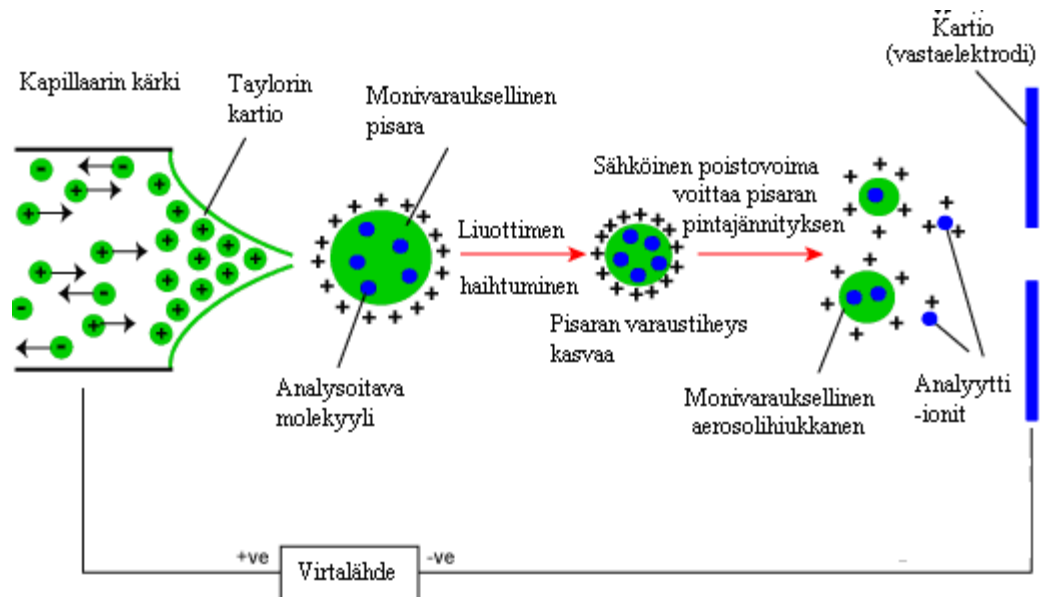
[6, s. 75–76.]

Matriisiefektillä tarkoitetaan näytteestä peräisin olevan aineksen häiritsevää vaikutusta analyytin ionisaatioprosessiin, ja se voi joko laskea tai nostaa analyytin retentioajalla esiintyvää signaalia. Matriisiefekti aiheutuu mitä todennäköisimmin sähkösumutusionisaatiossa muodostuneen pisan ominaisuuksien muutoksista, joita aiheuttavat pääasiassa haihtumattomat yhdisteet, joita ovat esimerkiksi sulfaatti- ja fosfaattisuolat sekä saostunut analyytin. Matriisiefekti vaikuttaa heikentävästi menetelmän toistettavuuteen, pitoisuuden tarkkuuteen sekä kvantitointialarajaan, ja se saattaa olla myös konsentraatiosta riippuvaista. Matriisiefektin suuruus ja kesto riippuvat mm. näytteenkäsittelytekniikasta, analyytin poolisuudesta, ajoliuoksen koostumuksesta sekä kromatografiasta. Matriisiefektin on raportoitu vaikuttavan enemmän sähkösumutusionisaatiota kuin ilmanpaineista kemiallista ionisaatiota käytettäessä. [1, s. 62, 207–210.]



Matriisiefektin ilmenemistä ja sen vaikutusta analyysiin voidaan ehkäistä valitsemalla sellainen näytteenkäsittelymenetelmä, jolla tutkittava analyyyti saadaan eristettyä näytematriisista mahdollisimman selektiivisesti, käyttämällä isotooppileimattua sisäistä standardia tai pienentämällä laitteistoon injektoitavaa näytemäärää. [1, s. 211–212.]

Kuvassa 2 on esitetty ionisaatioprosessi sähkösumutus-ionisaatiossa.



Kuva 2. Ionisaatioprosessi ESI-tekniikalla [8]

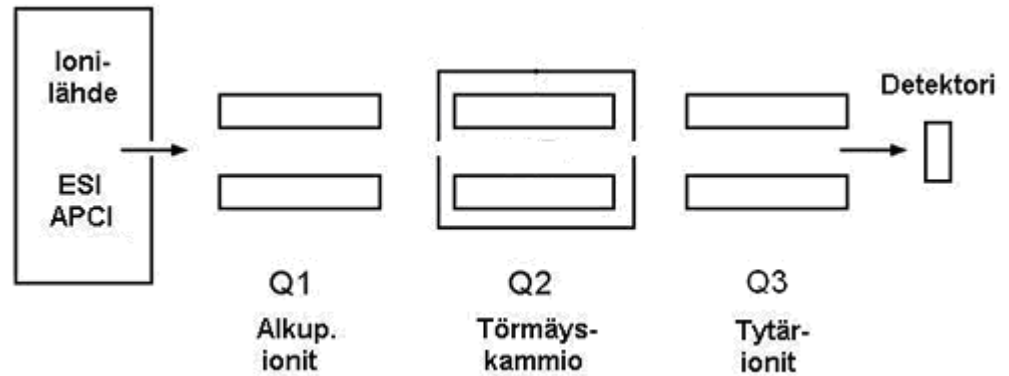
### 3.2.3 Tandemmassaspektrometrin kvadrupolit ja toimintaperiaate

Kvadrupolianalyysaattorit ovat käytetyimpiä massa-analyysilaitteita, sillä ne ovat edullisia, helppokäyttöisiä ja nopeita. Kvadrupolimassa-analyysaattori koostuu neljästä yhdensuuntaisesta metallisauvasta, joihin on kytketty vakiona pysyvä jännite-ero sekä värähtelevä radiotaajuuksinen muuttuva jännite. Sähkökenttä muuttaa ionien kulkurataa siten, että tietyillä jännitearvoilla vain tietyn massa-varaussuhteen omaavat ionit pääsevät dektektorille muiden massa-varaussuhteen omaavien ionien törmätessä metallisauvoihin. [5, s. 12.]

Tandemmassaspektrometriassa tutkittavalle analytyille suoritetaan kaksi tai useampia massa-analyysijakoa, joiden kunkin jälkeen kaikkien ionien joukosta voidaan valita tietyt tai kaikki ionit törmäytettäväksi inertin kaasun kanssa. Yleisin tandemmassa-analyysilaitteisto koostuu kolmesta peräkkäisestä kvadrupolista. Ensimmäinen kvadrupoli (Q1) tekee ensimmäisen

massa-analyysin ja toinen kvadrupoli (Q2) toimii törmäyskammiona. Toinen massa-analyysi suoritetaan kolmannessa kvadrupolissa (Q3), josta valitut ionit ohjataan detektorille. [5, s. 18–19.]

Kuvassa 3 on kaavakuva kolmoiskvadrupolista.



Kuva 3. Kolmoiskvadrupolin kaavakuva [5, s. 20]

#### 3.2.4 Ionien seurantatavat

Kolmoiskvadrupolia käytettäessä voidaan käyttää erityyppisiä pyyhkäisytekniikoita tai reaktioita. Tuoteionipyyhkäisyssä (Product Ion Scan) valitaan tietty lähtöioni ja määritetään kaikki siitä törmäytyksen vaikutuksesta syntyvät tuoteionit. Lähtöionipyyhkäisyssä (Precursor Ion Scan) valitaan sellaiset lähtöionit, jotka pilkkoutuvat tietyntalaiseksi tuoteioneiksi. Neutraalipalan hokeamispyyhkäisyssä (Neutral Loss Scan) voidaan tarkastella tiettyä neutraalin ryhmän pilkkoutumista kaikista molekyyleistä. [6, s. 123.]

Tässä opinnäytetyössä käytettiin SRM (Selected Reaction Monitoring) -tekniikkaa, jolla voidaan seurata tiettyä pilkkoutumista. Tällöin pyyhkäisytekniikkaa ei tarvita. SRM-tekniikalla valitut lähtöionit havaitaan vain siinä tapauksessa, mikäli ne tuottavat tietyn ennalta valitun tuoteionin. Kyseisellä tekniikalla saavutetaan parempi herkkyys, koska selektiivisyys on parempi ja sekä lähtö- että tuoteioneja voidaan seurata pitempiä aikoja. Myös taustakohina saadaan erittäin pieneksi. Ensimmäisellä massa-analyysaattorilla valitaan kaikkien ionien joukosta erilleen tietty (äiti-) ioni, jonka rakenne rikotaan törmäyttämällä se inerttiin kaasuun, esimerkiksi typpeen. Toisessa massa-analyysaattorissa valitaan tutkittavalle ionille ominainen tytär-ioni, joka päästetään detektorille. Detektio on tällä tekniikalla erittäin selektiivinen, sillä saman massa-varaussuhteen omaavat ionit karsiutuvat joukosta toisella massa-analyysillä. [6, s. 123.]

Detektorilla ionivirta muunnetaan sähköiseksi vasteeksi, jonka suuruus mitataan. Yleensä ionivirran suuruus on niin pieni, että sitä joudutaan vahvistamaan. Vahvistaminen tehdään elektronivahvistimilla, esimerkiksi kanavamonistinputkilla tai -levyillä. Lopulta saadaan tietojenkäsittelylaitteiston avulla tuotettua massaspektri, jossa intensiteetti kuvataan massa/varaus-arvon funktiona. [5, s. 19–20.]

## **4 MENETELMÄN KEHITYS**

Tässä opinnäytetyössä pyrittiin kehittämään kvantitatiivinen LC-/MS/MS-menetelmä, jolla tutkittava analytti voidaan määrittää riittävän luotettavasti ja toistettavasti. Menetelmän kehitys kokonaisuudessaan sisälsi massaspektrometrin asetusten ja nestekromatografian ajoasetusten optimoinnin sekä näytteenkäsittelymenetelmän kehityksen.

### **4.1 Laitteisto**

Työssä käytetty LC-MS/MS-laitteisto koostui Agilent Technologies 1100 -sarjan pumpuista, kolonniuunista sekä kaasunpoistoyksiköstä (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), CTC HTC PAL -automaattisesta näytteenottojärjestelmästä (CTC Analytics AG, Zwingen, Switzerland) ja Sciex LC/MS/MS API 4000-tandem-massaspektrometrilaitteistosta (Sciex, Toronto, Ontario, Canada) ilmanpaineisella ionilähteellä sekä TurbolonSpray interfaalla varustettuna. HPLC- ja massaspektrometrilaitteiston kontrollointi sekä tiedon keruun ja tallennus suoritettiin Sciex Analyst 1.4.2 data -ohjelmiston avulla.

## 4.2 Reagenssit ja välineet

Taulukossa 1 on esitetty työssä käytetyt reagenssit.

*Taulukko 1. Työssä käytetyt reagenssit*

Kemikaali/liuotin	Toimittaja tai valmistaja
Muurahaishappo (HCOOH) 100 %	Merck, Darmstadt, Germany
Asetonitrili (ACN)	Merck, Darmstadt, Germany
Vesi (H <sub>2</sub> O)	Tablettiosaston vesikeskus, Orion, Finland
Ammoniumasetaatti (NH <sub>4</sub> OAc)	Merck, Darmstadt, Germany
2- Propanoli (IPA)	Merck, Darmstadt, Germany
Metanoli (MeOH)	Merck, Darmstadt, Germany
Natriumhydroksidi (NaOH), 10 M laimennettuna 2M:ksi	Reagena, Toivala, Finland
n-Heksaani (Hx)	Merck, Darmstadt, Germany
Etyyliasetaatti (EtOAc)	Merck, Darmstadt, Germany

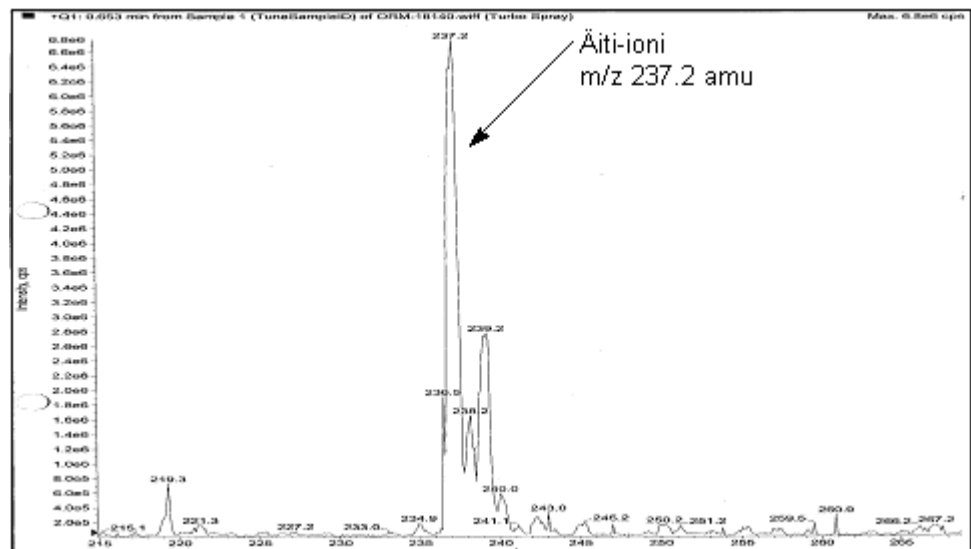
Taulukossa 2 on esitetty työssä käytetyt kolonnit.

*Taulukko 2. Työssä käytetyt kolonnit*

Kolonnit	Toimittaja tai valmistaja
Chromolith® Performance Rp-18e (endcapping), 100 * 4,6 mm	Merck KGaA, Germany
Atlantis® T3, 3 µm, 100 * 2,1 mm	Waters, Ireland

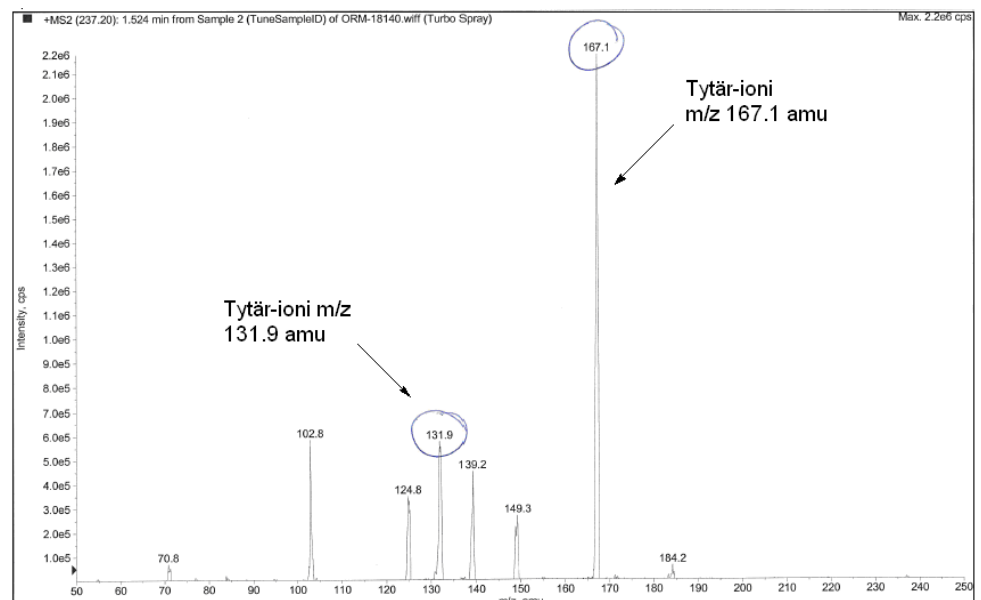
## 4.3 Massaspektrometrin optimointi

Menetelmän kehitys aloitettiin massa-analysaattorin optimoinnista. Massa-menetelmä optimoitiin tutkittavan analyytin suhteen 500 ng/ml vahvuisella ACN:H<sub>2</sub>O -seoksella (50:50). Optimointi tehtiin siten, että jännitteitä manuaalisesti vaihtamalla sekä negatiivisen että positiivisen ionisaation tuotteina etsittiin massaspektristä äiti-ionia, joka on joko luovuttanut tai vastaanottanut protonin, jolloin sen molekyylipaino on yhtä suurempi tai pienempi kuin tutkit-tavan yhdisteen molekyylipaino. Negatiivisen ionisaation puolella äiti-ionia ei havaittu, mutta positiivisella puolella äiti-ionin ([M+H]<sup>+</sup>) tuottama signaali ha-vaittiin selvästi. Kuvassa 4 on esitetty positiivisen puolen massaspektri.



Kuva 4. Puhdasaineen massaspektri positiivipuolella

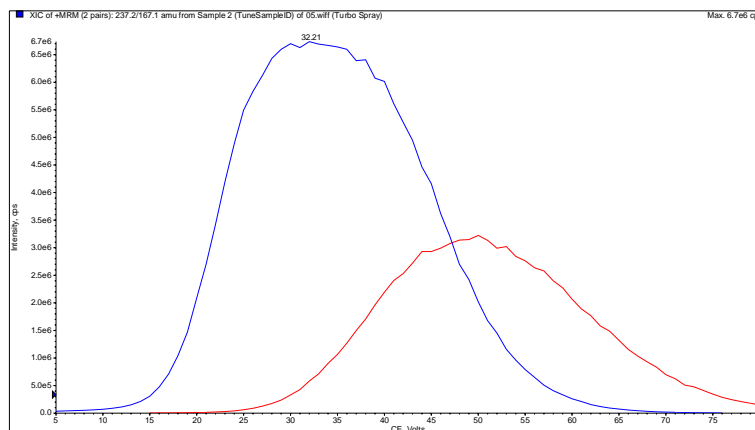
Tämän jälkeen jännitteitä muuttamalla yritettiin etsiä äiti-ionista typpikaasuun törmäytyksen seurauksena syntyneet fragmentit eli tytär-ionit. Jännitteitä vaihdettiin manuaalisesti siten, että syntyvien fragmenttien kokonaismäärä oli kohtuullinen ja tytär-ionien signaalit mahdollisimman vahvat. Kuvassa 5 on esitetty ionit, joiksi äiti-ioni hajoaa. Menetelmään valittiin reaktiot, joiden signaalit olivat vahvimmat. Tallennetut äiti-tytär-ioniparit olivat m/z 237,2/167,1 amu ja m/z 237,2/131,9 amu.



Kuva 5. Puhdasaineen massaspektri, jossa äiti-ionin hajoamisfragmentit

Tämän jälkeen suurin osa massaspektrometrin jännitteistä optimoitiin viisi kertaa laimeammalla muutoin samanlaisella liuoksella manuaalisesti siten,

että niistä saatava signaali olisi mahdollisimman suuri valituilla reaktioilla. Kuvassa 6 on esimerkkikuvaaja CE (Collision Energy) -jännitteen optimoinnista kahdella valitulla reaktiolla. Sininen käyrä kuvaa reaktiota 237,2/167,1 amu ja punainen käyrä reaktiota 237,2/131,9 amu.



Kuva 6. CE-jännitteen optimointikuvaaja

Jännitteet tallennettiin massamenetelmään. Loput massaspektrometrin parametreista optimoitiin haarukoimalla automaattista FIA (Flow Injection Analysis) -ohjelmaa käyttäen ja niistä saadut optimiarvot tallennettiin menetelmään. Taulukossa 3 on esitetty optimoinnissa saadut arvot.

Taulukko 3. Menetelmään valitut jännitteet ja lämpötila sekä kaasuasetykset

Optimoitu parametri	Valitut arvot/asetukset
Decluster Potential (V)	68
Entrance Potential (V)	10
Collision Energy reaktiolle 237,2/167,1 (V)	32
Collision Energy reaktiolle 237,2/131,9 (V)	50
Cell Exit Potential (V)	10
Temperature (°C)	650
Interface Heater (100 °C)	ON
Collision Activated Dissociation	10
Curtain Gas	15
Ion Source Gas 1	40
Ion Source Gas 2	65
Ion Spray Voltage (V)	4000

#### 4.4 Nestekromatografien ajo-olosuhteiden optimointi

Ajo-olosuhteiden optimoinnissa testattiin kahta erityyppistä kolonnia, erilaisia näyteliuottimen sekä ajoliuoksen 5 mM NH<sub>4</sub>OAc:ACN -suhteita, virtausnope-

uksia ja kolonniuunin lämpötiloja. Kromatogrammista seurattiin parametrien vaikutusta tutkittavan yhdisteen retentioaikaan, piikin muotoon sekä sen intensiteettiin.

Ensimmäiset kokeet suoritettiin Chromolith® Performance RP-18e -kolonnilla isokraattisella ajolla, jolloin ajoliuoksen koostumus pysyi koko ajan ajan samana. Ajoajaksi asetettiin aluksi 6 minuuttia. Analyytin pitoisuus näytteissä oli 1,00 ng/ml. Taulukossa 4 on esitetty testatut parametrit.

*Taulukko 4. Testatut parametrit Chromolith® Performance RP-18e -kolonnilla*

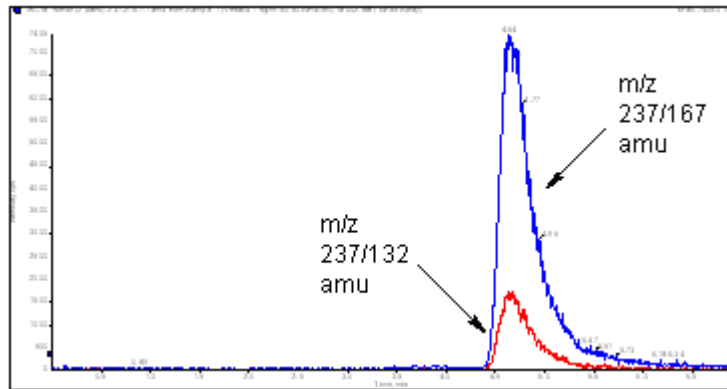
Näyte	Näyteliuotin (NH <sub>4</sub> OAc:ACN)	Ajoliuos (NH <sub>4</sub> OAc:ACN)	Ajoliuoksen virtausnopeus (µl/min)	Kolonnin lämpötila (°C)
1	50:50	50:50	600	20
2	20:80	20:80	600	20
3	20:80	20:80	600	40
4	20:80	20:80	800	20
5	20:80	20:80	1 000	20
6	20:80	20:80	1 000	30
7	20:80	20:80	1 000	40

Taulukossa 5 on esitetty kokeiden tulokset.

*Taulukko 5. Tulokset Chromolith® Performance RP-18e -kolonnilla ajetuista näytteistä*

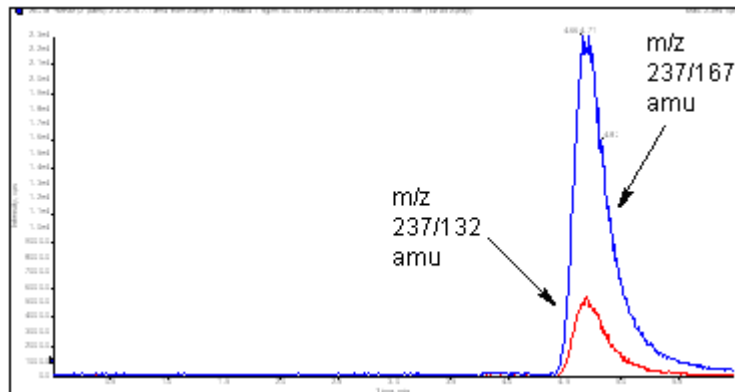
Näyte	Analyytin pitoisuus (ng/ml)	Retentioaika (min)	Piikin korkeus (cps)
1	1,00	4,6	7 400
2	1,00	5,0	15 000
3	1,00	4,5	24 000
4	1,00	3,5	18 000
5	1,00	2,8	18 000
6	1,00	2,7	25 000
7	1,00	2,6	28 000

Kuten taulukosta 5 nähdään, analyytin retentioajat olivat 2,6 ja 5,0 minuutin välillä. Analyytin retentioaikaan vaikuttavat olennaisesti ajoliuoksen virtausnopeus ja kolonniuunin lämpötila. Virtausnopeutta ja kolonniuunin lämpötilaa nostamalla saatiin tutkittavan analyytin retentioaikaa lyhyemmäksi, piikin signaali suuremmaksi sekä piikin leveyttä pienemmäksi. Kuvassa 7 on esitetty näytteen 1 kromatogrammi. Ajoliuoksen virtausnopeus oli 600 µl/min ja kolonniuunin lämpötila 20 °C. Näyteliuotin ja ajoliuos olivat 5 mM NH<sub>4</sub>OAc:ACN (50:50).



Kuva 7. Näytteen 1 kromatogrammi

Kuvassa 8 on esitetty näytteen 2 kromatogrammi. Ajoliuoksen virtausnopeus oli 600  $\mu\text{l}/\text{min}$  ja kolonniuunin lämpötila 20  $^{\circ}\text{C}$ . Näyteliutin ja ajoliuos olivat 5 mM  $\text{NH}_4\text{OAc}:\text{ACN}$  (20:80).

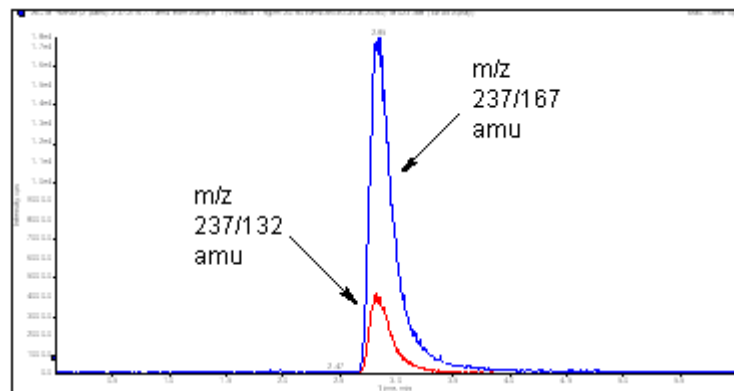


Kuva 8. Näytteen 2 kromatogrammi

Kuvista 7 ja 8 voidaan havaita, että ajoliuoksen ACN-osuuden kasvattaminen pidensi tutkittavan analyytin retentioaikaa. Tästä johtuen pyrittiin retentioaikaa saamaan lyhyemmäksi virtausnopeutta nostamalla. Piikin leveyttä pyrittiin pienentämään nostamalla kolonniuunin lämpötilaa.

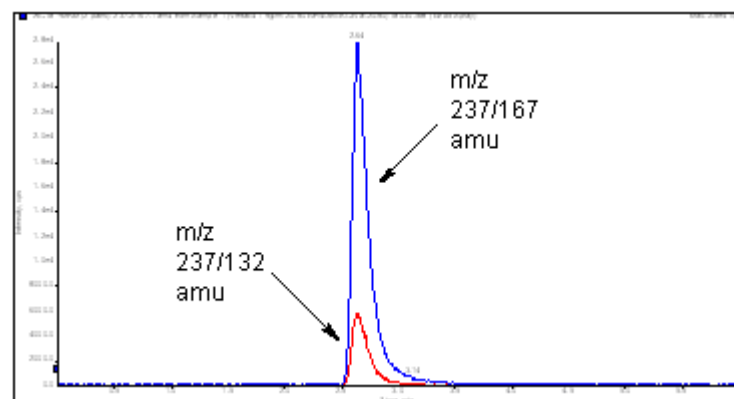


Kuvassa 9 on esitetty näytteen 5 kromatogrammi. Ajoliuoksen virtausnopeus oli 1 000 µl/min ja kolonniuunin lämpötila 20 °C. Näyteliuotin ja ajoliuos olivat 5 mM NH<sub>4</sub>OAc:ACN (20:80).



Kuva 9. Näytteen 5 kromatogrammi

Kuvassa 10 on esitetty näytteen 7 kromatogrammi. Ajoliuoksen virtausnopeus oli 1 000 µl/min ja kolonniuunin lämpötila 40 °C, näyteliuotin ja ajoliuos olivat 5 mM NH<sub>4</sub>OAc:ACN (20:80).



Kuva 10. Näytteen 7 kromatogrammi

Kuvista 9 ja 10 voidaan havaita, että virtausnopeuden ja kolonnin lämpötilan nostaminen lyhensivät tutkittavan yhdisteen retentioaikaa sekä kavensivat tutkittavan yhdisteen piikin leveyttä.

Ongelmana edellä ajettujen näytteiden kohdalla oli lähestulkoon kaikkien piikkien häntiminen, mikä viestii analyytin epätasaisesta eluoitumisesta kolonnista. Poolisen yhdisteen kohdalla olisi voitu testata gradienttiajoa kasvatamalla ajoliuoksen ACN-osuutta ajon loppupuolella, jolloin poolinen yhdiste eluoituisi yhtenäisempänä rintamana kolonnista. Yhdiste oli kemialliselta rakenteeltaan kuitenkin sellainen, että se sisälsi sekä poolisen että poolittoman

osan. Tästä johtuen päätettiin kokeita jatkaa erityyppisellä kolonnilla (Atlantis® T3). Näyteliuottimen ja ajoliuoksen 5 mM NH<sub>4</sub>OAc:ACN -suhteet päätettiin pitää toisiinsa nähden samoina (20:80). Näytteiden pitoisuudet olivat joko 0,100 ng/ml tai 1,00 ng/ml. Taulukossa 6 on esitetty testatut parametrit.

*Taulukko 6. Testatut parametrit Atlantis® T3-kolonnilla*

Näyte	Näyteliuotin (5 mM NH <sub>4</sub> OAc:ACN)	Ajoliuos (5 mM NH <sub>4</sub> OAc:ACN)	Ajoliuoksen virtausnopeus (µl/min)	Kolonnin lämpötila (°C)
1	50:50	20:80	200	20
2	50:50	20:80	200	30
3	50:50	20:80	200	40
4	20:80	20:80	200	20
5	20:80	20:80	200	30
6	20:80	20:80	200	40
7	20:80	20:80	300	20
8	20:80	20:80	300	30
9	20:80	20:80	300	40

Taulukossa 7 on esitetty saadut tulokset.

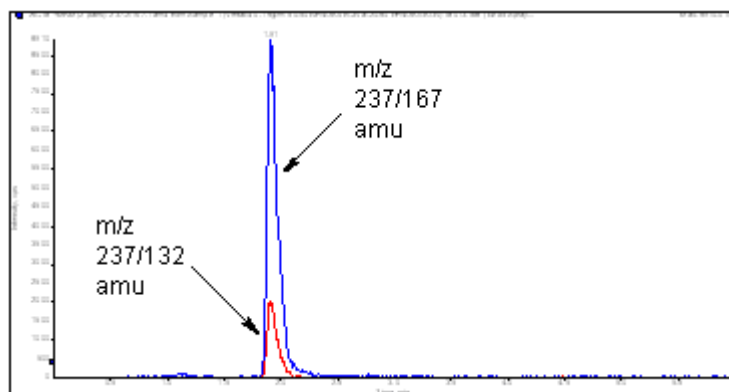
*Taulukko 7. Tulokset Atlantis® T3-kolonnilla ajetuista näytteistä*

Näyte	Analyytin pitoisuus (ng/ml)	Retentioaika (min)	Piikin korkeus (cps)
1	0,100	1,9	7 000
2	0,100	1,9	8 200
3	0,100	1,9	8 000
4	1,00	2,0	58 000
5	1,00	2,0	66 000
6	0,100	1,9	7 300
7	0,100	1,2	9 100
8	0,100	1,2	10 000
9	0,100	1,2	10 000

Kuten taulukosta 7 nähdään, retentioajat ovat huomattavasti lyhyemmät kuin edellisellä kolonnilla ajettujen näytteiden retentioajat. Taulukoista 6 ja 7 voidaan havaita, että kolonniuunin lämpötilan nostaminen sekä virtausnopeuden kasvattaminen lyhensivät tutkittavan yhdisteen retentioaikaa ja paransivat yhdisteen piikin intensiteettiä.

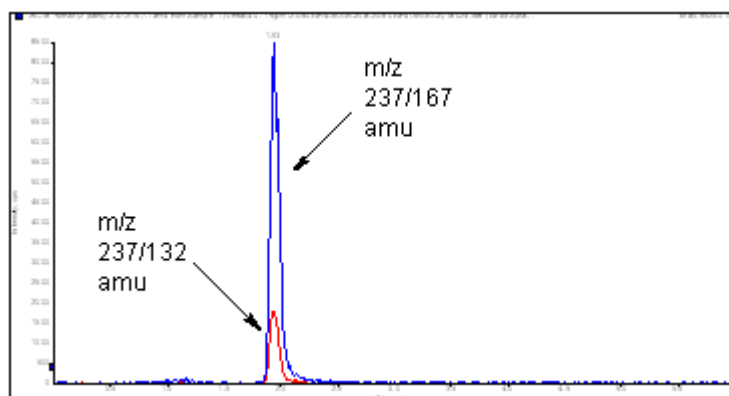
Ensimmäisten näytteiden kohdalla haluttiin testata, miten näyteliuottimen pienempi asetonitrilisuhteessa ajoliuoksen asetonitrilisuhteeseen vaikuttaa yhdisteen retentioaikaan, piikin muotoon ja sen intensiteettiin. Taulukoista 6 ja 7 voidaan havaita, että näyteliuottimen pienempi asetonitrii-

lisuhde suhteessa ajoliuoksen asetonitrilisuhteeseen ei juuri vaikuta yhdisteen retentioaikaan, mutta piikin intensiteetti on analyytin pitoisuuteen nähden suurempi niiden näytteiden kohdalla, joissa näyteliuottimen asetonitrilisuhte on suurempi kuin ajoliuoksen. Kuvassa 11 on näytteen 3 kromatogrammi. Ajoliuoksen virtausnopeus oli 200 µl/min ja kolonniuunin lämpötila 40 °C. Näyteliuotin oli 5 mM NH<sub>4</sub>OAc:ACN (50:50) ja ajoliuos oli 5 mM NH<sub>4</sub>OAc:ACN (20:80).



Kuva 11. Näytteen 3 kromatogrammi

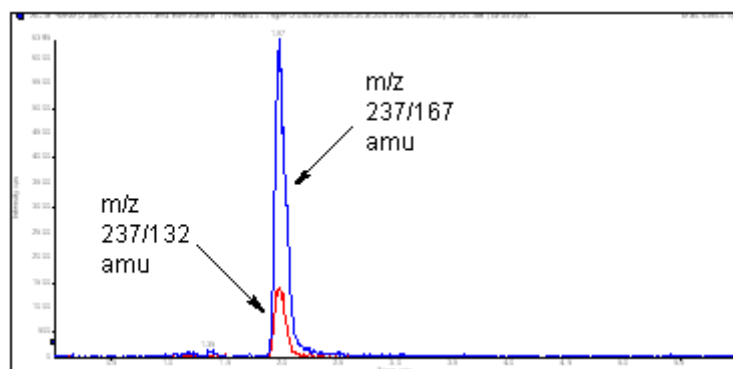
Kuvassa 12 on esitetty näytteen 6 kromatogrammi. Ajoliuoksen virtausnopeus oli 200 µl/min ja kolonniuunin lämpötila 40 °C, näyteliuotin ja ajoliuos olivat 5 mM NH<sub>4</sub>OAc:ACN (20:80).



Kuva 12. Näytteen 6 kromatogrammi

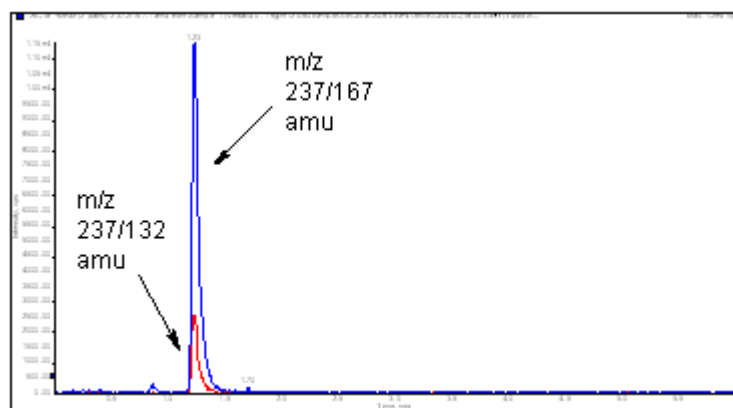
Kuvista 11 ja 12 voidaan havaita, että näyteliuottimen ja ajoliuoksen erilaiset asetonitrilisuhteet vaikuttivat pääasiassa piikin leveyteen. Koska analyytin haluttiin eluoituvan kolonnista mahdollisimman yhtenäisenä rintamana, päätettiin näyteliuottimen ja ajoliuoksen 5 mM NH<sub>4</sub>OAc:ACN-suhteet pitää samanlaisina toisiinsa nähden (20:80).

Kuvassa 13 on esitetty näytteen 5 kromatogrammi. Ajoliuoksen virtausnopeus oli 200 µl/min ja kolonniuunin lämpötila 30 °C, näyteliuotin ja ajoliuos olivat 5 mM NH<sub>4</sub>OAc:ACN (20:80).



Kuva 13. Näytteen 5 kromatogrammi

Kuvassa 14 on esitetty näytteen 9 kromatogrammi. Ajoliuoksen virtausnopeus oli 300 µl/min ja kolonniuunin lämpötila 40 °C. Näyteliuotin ja ajoliuos olivat 5 mM NH<sub>4</sub>OAc:ACN (20:80).



Kuva 14. Näytteen 9 kromatogrammi

Kuten kuvista 13 ja 14 nähdään, ajoliuoksen virtausnopeuden että kolonniuunin lämpötilan kasvattaminen lyhensivät tutkittavan yhdisteen retentio-aikaa ja kavensivat piikin leveyttä. Menetelmään valittiin Atlantis® T3-kolonne, koska sillä ajettujen näytteiden piikit olivat kapeita ja riittävän symmetrisiä.

Taulukossa 8 on esitetty menetelmään valitut nestekromatografian ajoasetukset.

*Taulukko 8. Menetelmään valitut nestekromatografian asetukset*

Ajoliuos	5 mMNH <sub>4</sub> OAc:ACN (20:80)
Ajoaika (min)	3,0
Virtausnopeus (μl/min)	300
Kolonniuunin lämpötila (°C)	40
Injektioilavuus (μl)	10
Näytteensyöttäjän pesuliukokset	25% ACN:25% 2% HCOOH:25% IPA:25% MeOH
	5 mM NH <sub>4</sub> OAc:ACN (50:50)

#### 4.5 Uttoliuotinvertailut neutraalissa ja emäksisessä pH:ssa

Näytteenkäsittelymenetelmän kehitys sisältää monia optimoitavia asioita, joi-  
loin on tärkeää ymmärtää niistä kunkin vaikutus uuttumisprosessiin. Or-  
gaanisen uuttoliuottimen valinta on erittäin tärkeä osa kokonaisuutta. Sen  
polaarisuus vaikuttaa siihen, minkä tyyppisiä molekyylejä se parhaiten uut-  
taa näytematriisista. Mitä enemmän uuttoliuotinta on suhteessa näytteen si-  
sältämään vesifaasiin, sen tehokkaampaa uuttuminen todennäköisesti on.  
Näytteen pH:n säätö on myös erittäin tärkeää. Mikäli uutetaan happamia yh-  
disteitä, näyte käsitellään tavallisesti suolahapolla tai muurahaishapolla. Mi-  
käli uutettava analyytti on emäksinen, näyte käsitellään vastaavasti ammo-  
niakilla tai natriumhydroksidilla. [1, s. 319–320.]

Näytteenkäsittelymenetelmää kehitettäessä olisi hyvä testata riittävän mon-  
taa orgaanista liuotinta tai niiden yhdistelmää ainakin kahdessa eri pH:ssa.  
Lopulliseen uuttoliuottimen valintaan sekä pH:n säätöön vaikuttavat mene-  
telmän toistettavuus, oikeellisuus, uutettavan analyytin saanto, näytteen  
puhtaus, turvallisuusasiat sekä liuottimen kohtuullinen haihtumisaika.  
[1, s. 319–323.]

Analyytin uuttumista hiiren plasmasta testattiin sekä neutraalissa että emäk-  
sisessä pH:ssa. Uuttovertailuissa uuttoliuottimien etyyliasetaatti-heksaani  
(EtOAc:Hx) -suhteet olivat 20:80; 50:50 ja 80:20. Uuttokokeita varten valmis-  
tettiin spiikattuja näytteitä, joiden pitoisuudet analyytin suhteen olivat 0  
(blank); 0,100; 0,250; 10,0; 100 ja 250 ng/ml. Laimennokset tehtiin liuoksel-  
la, jonka Milli-Q-vesi-asetonitrilisuhte oli 1:1. Näytteissä analyytin pitoisuus  
oli lopulta 1/10 varsinaisesta laimennoksesta, sillä niihin pipetoitiin 450 μl hii-

ren nollaplasmaa ja 50 µl laimennettua standardiliuosta. Taulukossa 9 on havainnollistettu laimennosliuosten tekoa.

*Taulukko 9. Laimennustaulukko menetelmänkehityksessä*

Laimennettava liuos (ng/ml)	Laimennettava määrä (µl)	H <sub>2</sub> O:ACN (1:1) määrä (µl)	Pitoisuus liuoksessa (ng/ml)	Pitoisuus spikatussa näytteessä (ng/ml)
100 000	250	4 750	5 000	-
5 000	1 000	1 000	2 500	250
5 000	400	1 600	1 000	100
1 000	200	1 800	100	10,0
100	200	1 800	10,0	-
10,0	500	1 500	2,50	0,250
10,0	200	1 800	1,00	0,100

Neutraalissa uutossa pipetoitiin kutakin tekonäytettä 50 µl puhtaaseen lasiseen koeputkeen ja lisättiin uuttoliuotinta 3 ml. Tämän jälkeen vorteksoitiin kolme minuuttia ja sentrifugoitiin (4 000 rpm, 10 °C, 7 min). Lasiputket siirrettiin pakastimeen (-80 °C) noin 15 minuutiksi, kunnes koeputken pohjalle jäävä vesikerros jäättyi. Tämän jälkeen uuttoliuotinkerros kaadettiin uuteen lasiseen koeputkeen. Uuttoliuotin haihdutettiin tyypellä Turbo Vapissa (40 °C; 5 psi) melkein kuiviin, lisättiin 200 µl uuttoliuotinta, vorteksoitiin ja haihdutettiin kuiviin. Haihdutusjäännöksen päälle pipetoitiin 200 µl 5 mM NH<sub>4</sub>OAc:ACN (20:80), koeputkea vorteksoitiin ja siinä olevasta liuoksesta noin 150 µl näytevialiin ja analysoitiin API 4 000 LC-/MS/MS-laitteistolla aiemmin kehitetyllä menetelmällä.

Emäksinen uutto toteutettiin siten, että tekonäytteen pipetoinnin jälkeen koeputkeen lisättiin 20 µl 2 M natriumhydroksidia ja sitä vorteksoitiin. Muutoin näytteet käsiteltiin täysin samalla tavalla kuin neutraalissa uutossa. Ajettuja näytteitä ennen ja niiden jälkeen analysoitiin blank-näyte, jotta nähtäisiin näytteenkäsittelymenetelmästä aiheutuva kontaminaatio kunkin sarjan kohdalla. Jotta saatuja tuloksia voitaisiin verrata keskenään, luotiin menetelmälle kvantitointimetodi, Metodissa analyytin retentioaika oli 1,4 minuuttia ja pii-  
kit integroitiin niiden pinta-alojen perusteella molemmilla aiemmin valituilla äiti-tytär-ionipareilla.

Taulukossa 10 on esitetty piikkien pinta-alat neutraalissa uutossa sekä uut-toliuottimien EtOAc:Hx -suhteet.

*Taulukko 10. Piikkien pinta-alat neutraalissa uutossa eri liuotinseoksilla*

Tekonäytteen pitoisuus (ng/ml)	EtOAc:Hx 20:80	EtOAc:Hx 50:50	EtOAc:Hx 80:20
	Pinta-ala (cps)	Pinta-ala (cps)	Pinta-ala (cps)
Blank <sub>1</sub>	2 110	1 740	1 340
0,100	5 310	8 250	7 130
0,250	10 100	12 700	16 300
10,0	313 000	448 000	524 000
100	2 940 000	4 970 000	4 850 000
250	7 040 000	10 000 000	10 700 000
Blank <sub>2</sub>	8 270	9 510	12 400

Taulukossa 11 on esitetty piikkien pinta-alat emäksisessä uutossa sekä uut-toliuottimien EtOAc:Hx -suhteet.

*Taulukko 11. Piikkien pinta-alat emäksisessä uutossa eri liuotinseoksilla*

Tekonäytteen pitoisuus (ng/ml)	EtOAc:Hx 20:80	EtOAc:Hx 50:50	EtOAc:Hx 80:20
	Pinta-ala (cps)	Pinta-ala (cps)	Pinta-ala (cps)
Blank <sub>1</sub>	1 690	-	3 430
0,100	7 300	6 340	7 530
0,250	19 300	12 400	17 500
10,0	537 000	456 000	608 000
100	6 310 000	5 820 000	6 150 000
250	15 200 000	11 700 000	13 500 000
Blank <sub>2</sub>	18 900	8 980	13 700

Kuten taulukoista 10 ja 11 nähdään, saman pitoisuustason emäksisen uuton piikkien pinta-alat olivat hieman suuremmat kuin neutraalin uuton, mutta merkittävää eroa pinta-aloilla ei tulosten mukaan ollut. Menetelmän näytteenkäsittelyyn valittiin emäksinen uutto, koska tutkittava analyyyti olisi todennäköisemmin neutraalissa muodossa sen emäksisestä luonteesta johtuen. Tällöin uuttumisen voidaan ennustaa olevan sekä tehokasta että toistettavaa.

Kuten taulukosta 11 nähdään, uuttuminen on kaiken kaikkiaan tehokkainta silloin, kun EtOAc:Hx -suhde on 20:80. Väkevimmän näytteen jälkeen ajettuun blank-näytteen pitoisuuteen eli carry overiin liuotinkoostumus kuitenkin vaikutti. Vähiten carry overia havaittiin, kun etyyliasetaatin ja heksaanin suhde oli 50:50 ja eniten, kun niiden suhde oli 20:80. Vaikka carry over oli suurin

etyyliasetaatin ja heksaanin suhteen ollessa 20:80, se valittiin uuttoliuottimeksi. Valintaan vaikutti myös se, että etyyliasetaatin on vahva uuttoliuotin, joka saattaa uuttaa matriisista myös analyysiä häiritseviä komponentteja erityisesti silloin, kun näyte uutetaan esimerkiksi aivo- tai maksahomogenaatista. Tällöin puhutaan matriisiefektistä, joka vähentää menetelmän herkkyyttä ja likaa laitteistoa. Tutkimus kokonaisuudessaan sisälsi plasma-, aivo- ja maksanäytteitä, jolloin oli luontevinta valita uuttoliuotin, jolla ennalta ehkäistäisiin mahdollista matriisiefektiä.

## 5 MENETELMÄN TESTAUS

Menetelmää testattiin Orion Pharman bioanalytiikan laboratorion sisäisen SOP (Standard Operating Procedure) -toimintaohjeen (Kvantitatiivisen bioanalytiikan menetelmä ja sen testaus) edellyttämällä tavalla. Ohjeessa kuvataan ne toimintatavat, joiden mukaan toimitaan lääkekehityksen alkuvaiheen (discovery-vaihe) tutkimusten kvantitatiivisessa bioanalytiikassa, ja se sisältää tärkeimmät menetelmän luotettavuuden arviointiin käytettävät testit. Testattavia asioita ovat muun muassa spesifisyys ja selektiivisyys, kalibrointi, tarkkuus, toistettavuus ja tutkittavan analyytin säilyvyys. Myös laitteen toimintakykyä testataan analysoimalla vertailunäyte (puhdas analyytin loppuliuotuksessa) aina jokaisen sarjan alussa ja lopussa, jolloin saadaan informaatiota mahdollisista herkkyyden muutoksista ajon aikana.

Tarve laajempiin lisätesteihin syntyy tyypillisesti silloin, mikäli menetelmän kehityksessä tai jo kehitetyn menetelmän toimivuudessa havaitaan ongelmia. Uusista molekyyleistä tehdyt havainnot ovat arvokasta tietoa lääkekehityskandidaattien myöhemmän kehityksen kannalta. Tässä opinnäytetyössä testattiin SOP-toimintaohjeesta poiketen myös analyytin saanto ja matriisiefekti.

Nollamatriisina käytettiin saman erän hiiren  $K_2$ -EDTA-nollaplasmaa, jota on kaupallisesti saatavilla (Harlan Sera-Lab, England). Nollaplasmaasta valmistettiin kalibrointistandardit, laadunvalvontanäytteet (QC, Quality Control), saantokoenäytteet sekä matriisiefektin blank-näytteet. Nollaplasmaa säilytettiin  $-20^{\circ}\text{C}$ :ssa ja valmistettuja näytteitä säilytettiin  $-80^{\circ}\text{C}$ :ssa.



## 5.1 Näytteiden valmistus ja käsittely

### 5.1.1 Kalibrointistandardien ja QC-näytteiden valmistus

Kantaliuokset valmistettiin asetonitriliin siten, että niiden pitoisuudet olivat 100 µg/ml. Kantaliuokset valmistettiin tummiin lasisiin mittapulloihin ja säilytettiin jääkaapissa (+4°C). Kalibrointistandardit valmistettiin eri kantaliuoksesta kuin QC-näytteet.

Kalibrointistandardit valmistettiin lasisissa koeputkissa lisäämällä 50 µl standardilaimennosta 450 µl:aan hiiren nollaplasmaa ja vorteksoimalla koeputkea 10–15 sekuntia. Blank-näytteet valmistettiin pipetoimalla standardilaimennoksen tilalle 50 µl H<sub>2</sub>O:ACN (50:50). Tämän jälkeen standardinäytteet jaettiin eppendorf-putkiin (á 75 µl) ja pakastettiin välittömästi -80°C:seen. Taulukossa 12 on havainnollistettu kalibrointistandardiliuosten laimennosten valmistusta.

*Taulukko 12. Standardinäytteiden laimennustaulukko*

Laimennettava liuos	Laimennettava määrä (µl)	Laimennus lisäten H <sub>2</sub> O:ACN (50:50) (µl)	Pitoisuus liuoksessa (ng/ml)	STD (ng/ml)
Kantaliuos 1	50	950	5 000	-
5 000	500	500	2 500	250
5 000	300	1 200	1 000	100
1 000	500	500	500	50,0
1 000	250	750	250	25,0
1 000	200	1 800	100	10,0
100	500	500	50,0	5,00
100	250	750	25,0	2,50
100	200	1 800	10,0	1,00
10,0	500	500	5,00	0,500
10,0	250	750	2,50	0,250
10,0	100	900	1,00	0,100

QC-näytteiden avulla menetelmän toimivuutta testattiin sekä ennen sen käyttöönottoa että käyttöönoton jälkeen koko projektin ajan. QC-näytteet valmistettiin kuten kalibrointistandardit, mutta hiiren nollaplasman määrä oli 900 µl ja standardilaimennoksen määrä 100 µl. QC-näytteet jaettiin eppendorf-putkiin (á 140 µl) ja pakastettiin välittömästi -80°C:ssa. Määritysalarajan tutkimista varten valmistetut QC-näytteet (0,100 ja 0,250 ng/ml) valmistettiin kuten edellä, mutta niissä hiiren nollaplasman määrä oli 450 µl ja QC-laimennoksen määrä 50 µl. Kalibrointistandardit ja QC-näytteet käsiteltiin samalla tavoin kuin varsinaisen tutkimuksen näytteet. Näytteenkäsittely on

kuvattu kohdassa 5.1.3. Taulukossa 13 on havainnollistettu QC-näytteiden laimennosten valmistusta.

*Taulukko 13. QC-näytteiden laimennustaulukko*

Laimennettava liuos	Laimennettava määrä (µl)	Laimennus lisäteen H <sub>2</sub> O:ACN (50:50) (µl)	Pitoisuus liuoksessa (ng/ml)	QC (ng/ml)
Kantaliuos 2	100	4 900	2 000	200
2 000	100	2 400	80,0	8,00
80,0	100	1 900	4,00	0,400
4,00	1 250	750	2,50	0,250
4,00	250	750	1,00	0,100

#### 5.1.2 Saantokoe- ja saantovertailunäytteiden valmistus

Saantokoe tehtiin kolmella eri pitoisuudella, 0,100; 8,00 ja 200 ng/ml, jotta se kattaisi mahdollisimman suuren osan kalibrointisuoran alueesta (0,100–250 ng/ml).

Saantokoenäytteet valmistettiin lasisissa koeputkissa lisäämällä 50 µl standardilaimennosta 450 µl:aan hiiren nollaplasmaa ja vorteksoimalla koeputkea 10–15 sekuntia. Tämän jälkeen saantokoenäytteet jaettiin eppendorfputkiin (á 75 µl) ja pakastettiin välittömästi -80°C. Seuraavassa taulukossa 14 on havainnollistettu saantokoenäytteiden laimennosten valmistusta.

*Taulukko 14. Saantokoenäytteiden laimennostaulukko*

Laimennettava liuos	Laimennettava määrä (µl)	Laimennus lisäteen H <sub>2</sub> O:ACN (50:50) (µl)	Pitoisuus liuoksessa (ng/ml)	Saantokoenäyte (ng/ml)
Kantaliuos 3	100	4 900	2 000	200
2000	100	2 400	80,0	8,00
80,0	100	1 900	4,00	0,400

Saantovertailunäytteet valmistettiin siten, että 450 µl hiiren 0-plasmaa lisättiin 50 µl ACN:H<sub>2</sub>O ja vorteksoitiin koeputkea 10–15 sekuntia. Tämän jälkeen näytteet jaettiin eppendorfputkiin (á 75 µl) ja pakastettiin välittömästi -80°C:seen.

Saantokoenäytteet ja saantovertailunäytteet käsiteltiin kohdan 5.1.3 mukaisesti. Loppuliuottimen lisäysvaiheessa saantokoenäytteet loppuliuotettiin ajoliuokseen (5 mM NH<sub>4</sub>OAc:ACN 20:80). Näytteenkäsittelyssä näyte laimenei neljäsosaan alkuperäisestä pitoisuudesta, jolloin kuusi rinnakkaista saantovertailunäytettä loppuliuotettiin ajoliuokseen, jossa analyysin pitoisuus oli

0,100; 2,00 tai 50,0 ng/ml. Laimennokset valmistettiin jatkamalla taulukon 14 laimennoksia siten, että kustakin laimennoksesta valmistettiin 40-kertainen laimennos ajoliuokseen. Saantokoe- ja saantovertailunäytteistä siirrettiin noin 150 µl näytevialiin ja analysoitiin API4000 LC/MS/MS-laitteistolla aiemmin kehitetyllä menetelmällä.

### 5.1.3 Näytteenkäsittely

Pakastetut näytteet sulatettiin huoneenlämpöisessä vedessä ja pipetoitiin kutakin 50 µl uuteen lasiputkeen. Tämän jälkeen lisättiin 20 µl 2 M NaOH ja vorteksoitiin 3 - 5 sekuntia. Näytteet uutettiin 3 ml:lla EtOAc:Hx (20:80) ja vorteksoimalla kolme minuuttia. Tämän jälkeen näytteet sentrifugoitiin (4 400 rpm, 7 min, 10 °C) ja pakastettiin -80°C:ssa noin kymmenen minuuttia, kunnes vesifaasi jäättyi. Ylempi orgaaninen faasi kaadettiin puhtaaseen lasiputkeen ja haihdutettiin Turbo Vap LV -haihdutusyksikössä (N<sub>2</sub>, 5 psi, 10 minuuttia) lähes kuiviin. Putken reunat huuhdeltiin 200 µl:lla uuttoliuotinta, vorteksoitiin ja haihdutettiin uuttoliuotin kuiviin. Haihdutusjäännöksen päälle lisättiin 200 µl ajoliuosta (5 mM NH<sub>4</sub>OAc:ACN 20:80), siirrettiin siitä noin 100 µl näytevialiin ja analysoitiin API4000 LC/MS/MS-laitteistolla aiemmin kehitetyllä menetelmällä.

## 5.2 Testatut parametrit

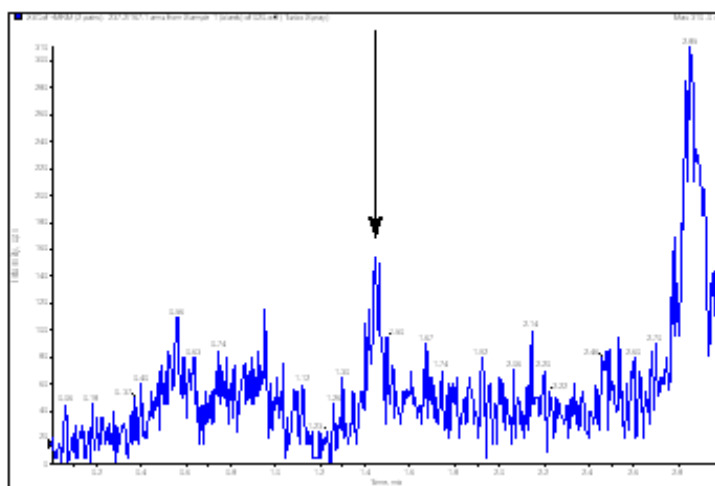
Menetelmän testaus suoritettiin ennen sen käyttöönottoa ja menetelmän toimivuutta arvioitiin varsinaisen tutkimuksen yhteydessä Orion Pharman SOP-toimintaohjeen edellyttämällä tavalla. Tutkittavat asiat olivat spesifisyys ja selektiivisyys, kalibrointi, carry over, määritysalaraja, menetelmän oikeellisuus ja toistettavuus sekä analyytin säilyvyys. Tässä opinnäytetyössä testattiin SOP-ohjeesta poiketen myös analyytin saanto ja matriisiefekti. Seuraavissa kappaleissa on esitetty testatut parametrit ja niistä saadut tulokset.

### 5.2.1 Spesifisyys ja selektiivisyys

Spesifisyydellä tarkoitetaan menetelmän kykyä mitata vain tarkoitettua analyttiä ja selektiivisyydellä menetelmän kykyä mitata tarkasti ja spesifisesti kyseistä analyttiä silloin, kun näytematriisissa esiintyy muita komponentteja menetelmän testiolosuhteissa [9, s. 27].

HPLC-MS/MS-analyysit ovat spesifisiä, sillä niissä analyytit eristetään analyysiä mahdollisesti häiritsevästä näytematriisin komponenteista. SRM-tekniikkaa käytettäessä on hyvin pieni todennäköisyys, että samalla retentioajalla eluoituu jokin muu yhdiste, jonka äiti-ionin sekä tytäri-ionien massat ovat täysin samat kuin tutkittavan analyytin. [6, s. 188; 10, s. 72.]

Spesifisyyttä tutkittiin analysoimalla plasmanäytteitä, jotka eivät sisällä tutkittavaa analyyttiä. Kyseiset blank-näytteet käsiteltiin samalla tavalla kuin tutkimusnäytteet. Tutkittavan analyytin retentioajan tiedettiin olevan 1,4 minuuttia, jolloin blank-näytteen kromatogrammista seurattiin mahdollisesti samaan aikaan eluoituvaa häiritsevää piikkiä. Suurin sallittu nollamatriisista aiheutuva häiriö on 35 % analyytin aiheuttamasta vasteesta kvantitointialarajalla. Kuvassa 15 on esitetty blank-näytteen kromatogrammi.



*Kuva 15. Blank-näytteen kromatogrammi*

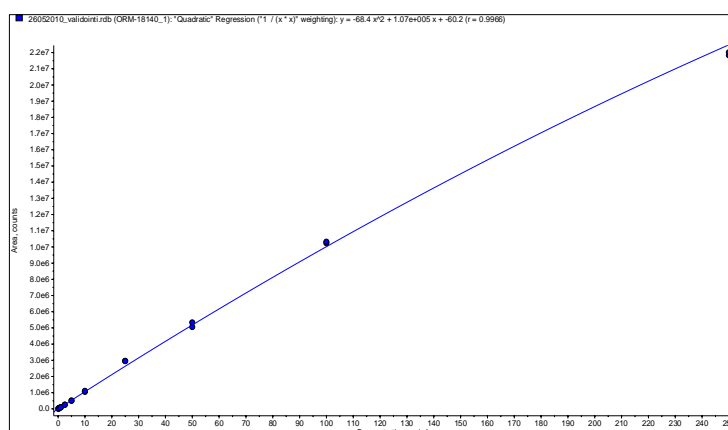
Kuten kuvasta 15 nähdään, analyytin retentioajalla (1,4 min) näkyvän piikin korkeus on niin pieni, että se juuri erottuu taustasta. Kuvasta voidaan näin ollen päätellä, että analyytin retentioajalla ei eluoidu analyysiä häiritseviä yhdisteitä ja menetelmä on spesifinen tutkittavalle analyyttille. Blank-näytteen aiheuttama häiriö kvantitointialarajalla (kuva 19) on niin pieni, ettei sillä tässä tapauksessa ole merkitystä menetelmän spesifisyyden kannalta.

### *5.2.2 Kalibroinnin lineaarisuus, oikeellisuus ja toistettavuus*

Menetelmän kalibrointi oli ulkoinen ja sen testauksessa kalibrintistandardien määrä oli 11 (0,100–250 ng/ml). Kalibrintialue valittiin aiempien tutkimustulosten perusteella, joissa tutkittava analyytti oli ollut samankaltainen.

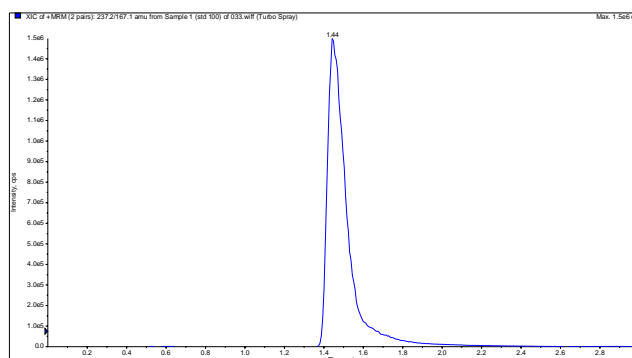
Kyseisissä tutkimuksissa myös koe-eläinlaji, annostelu ja tutkimusnäytemat-  
riisit olivat olleet identtisiä. Testitulosten perusteella menetelmälle valittiin  
määritysalue ja paras kalibrointimalli. Testatut suoran sovitukset olivat line-  
aarinen ja quadraattinen painotuksilla  $1/x$  ja  $1/x^2$ .

Kalibrointikuvaaja kaartui hieman konsentraation kasvaessa, jolloin lineaaris-  
ta suoran sovitusta ei voitu käyttää. Tästä voidaan päätellä, että signaali ei  
kasva lineaarisesti pitoisuuden kasvaessa. Sekä  $1/x$  että  $1/x^2$  painotukset  
sallivat suuremman vaihtelun kalibrointistandardeille suurilla pitoisuuksilla.  
Kalibrointistandardit sopivat suoralle paremmin  $1/x$  kuin  $1/x^2$  painotuksella.  
Edellisistä valittiin kuitenkin  $1/x^2$  painotus, koska vain sitä käyttämällä testi-  
sarjan QC-näytteet saatiin paremmin sovitettua kuvaajalle ja määritysalara-  
jaksi saatiin 0,100 ng/ml. Kuvassa 16 on esitetty testisarjan kalibrointikuva-  
ja, johon valittiin reaktio  $m/z$  237,2/137,1 amu sen suuremman intensiteetin  
vuoksi.



Kuva 16. Menetelmän kalibrointikuvaaja, Quadratic regression ( $1/x^2$  weighting)

Kuvassa 17 on esimerkkikromatogrammi kalibrointistandardista, jonka pitoi-  
suus oli 100 ng/ml.



Kuva 17. Kalibrointistandardi 100 ng/ml

Kalibroinnin oikeellisuutta ennen tutkimusta arvioitiin riippumattomien QC-näytteiden avulla. Viiden pitoisuustason neljän rinnakkaisen QC-näytteen kalibroitikuvaajan avulla lasketut pitoisuudet saavat poiketa suoralta enintään 30 %. Mikäli QC-näytteiden pitoisuudet ovat annetuissa rajoissa ( $\pm 30$  %), on kalibroitikuvaaja oikealla tasolla. Taulukossa 15 on esitetty testinäytesarjan QC-näytteiden lasketut pitoisuudet ja niiden prosenttipoikkeamat kalibroitikuvaajalta.

*Taulukko 15. QC-näytteiden pitoisuudet ja erot odotusarvoihin*

Todellinen pitoisuus (ng/ml)	Laskettu pitoisuus (ng/ml)	Ero odotusarvoon (%)
0,100	0,0873	-13
0,100	0,0900	-10
0,100	0,0975	-2,5
0,100	0,0912	-8,8
0,250	0,246	-1,6
0,250	0,258	3,2
0,250	0,258	3,2
0,250	0,268	7,2
0,400	0,405	1,3
0,400	0,461	15
0,400	0,446	12
0,400	0,437	9,0
8,00	7,28	-9,0
8,00	7,96	-0,50
8,00	8,24	3,0
8,00	8,35	4,4
200	163	-18
200	194	-3,0
200	179	-11
200	179	-11

Kuten taulukosta nähdään, kaikki lasketut prosenttipoikkeamat kalibroitikuvaajalta ovat välillä -18 ja 15 %, eli annettujen rajojen sisällä.

Kalibrointia arvioitiin tutkimuksen aikana siten, että kalibroitikuvaajien pisteiden takaisinlaskettujen pitoisuuksien keskiarvoja verrattiin vastaaviin odotusarvoihin. Toistettavuutta arvioitiin suhteellisen keskihajonnan avulla.

Suhteellinen keskihajonta voidaan laskea kaavasta 1:

$$RSD\% = \left( \sqrt{\frac{\sum (\bar{x} - x_i)^2}{n-1}} / \bar{x} \right) * 100 \% \quad (1)$$

jossa

$n$  = toistojen lukumäärä

$\bar{x}$  = keskiarvo

$x_i$  = yksittäinen mittaustulos

Taulukossa 16 on esitetty takaisin laskettujen pitoisuuksien keskiarvot, prosentuaaliset erot odotusarvoihin ja suhteelliset keskihajonnat (RSD%). Kalibrointistandardien takaisin laskettujen pitoisuuksien keskiarvo saa poiketa kyseisestä odotusarvosta enintään 30 % ja keskihajonta saa olla maksimissaan 30 %.

*Taulukko 16. Kalibrointisuorien takaisin laskettujen pitoisuuksien keskiarvot, erot odotusarvoihin, keskihajonnat sekä suhteelliset keskihajonnat*

	STD 0,100	STD 0,250	STD 0,500	STD 1,00	STD 2,50	STD 5,00	STD 10,0	STD 25,0	STD 50,0	STD 100	STD 250
Keskiarvo (ng/ml)	0,0969	0,268	0,511	1,00	2,40	4,61	10,2	24,2	53,9	100	246
Ero odotusarvoon (%)	-3,2	7,3	2,2	-0,3	-3,9	-7,9	2,2	-3,3	7,9	0,4	-1,5
RSD%	6,5	8,7	6,6	3,9	5,0	6,1	4,6	9,9	6,8	5,9	3,5
n	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

Kuten taulukosta 16 nähdään, ero odotusarvoon on -7,9–7,9 prosentin välillä, eli kalibrointistandardien sopivuus sovitetulle kuvaajalle on tästä päätellen riittävän tarkka. Pienten ja suurten pitoisuuksien eroissa odotusarvoihin ei ole havaittavissa suuria eroja.

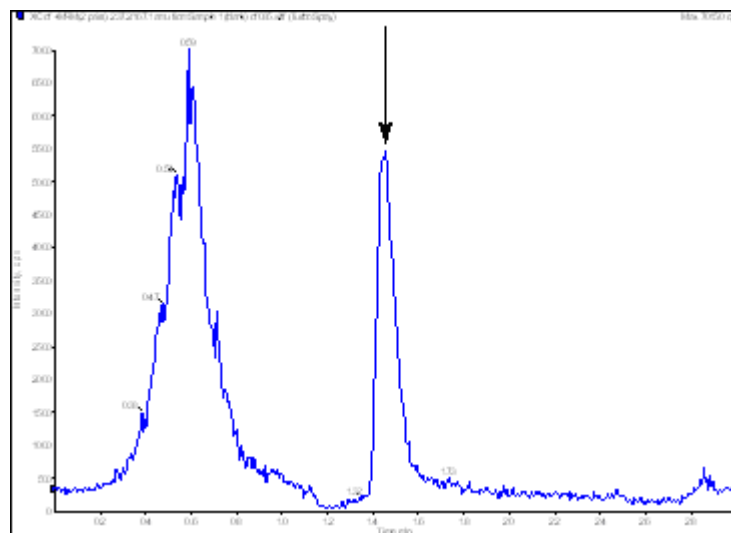
Kalibroinnin toistettavuutta arvioitiin suhteellisen keskihajonnan (RSD%) avulla. Kuten taulukosta nähdään, suhteellinen keskihajonta on välillä 3,5–9,9 %. Myös toistettavuus on hyväksymisrajojen sisällä. Tulosten perusteella voidaan kalibroinnin olettaa olevan myös toistettavaa.

### 5.2.3 Carry over

Carry over tarkoittaa kontaminaatiota, joka voi johtua analyytin tarttumisesta laboratoriovälineisiin tai laitteistoon. Mikäli analyytti absorboituu laitteistoon, sen aiheuttama signaali nähdään myös seuraavissa injektioissa. Absorboituminen on hyvin molekyylikohtaista, mutta sitä tapahtuu aina jonkin verran, ja useimmiten se aiheuttaa ongelmia hyvin pienillä pitoisuustasoilla työskenneltäessä. Laboratorioastioista ja välineistä aiheutuvaa kontaminaatiota voidaan välttää huolellisella työskentelyllä. Laitteiston kontaminaatiota voidaan ehkäistä näytejärjestyksen suunnittelulla sekä tehokkaiden injektorin pesumenetelmien käytöllä. [6, s.190.]

Korkein sallittu edellisestä näytteestä johtuvan carry overin osuus on 30 % seuraavan piikin pinta-alasta, mutta sen vaikutusta tutkimusnäytteiden pitoisuuksiin pyritään poistamaan tai ainakin minimoimaan. Carry overia voidaan ehkäistä esimerkiksi lisäämällä riittävästi liuotin- tai blank-näytteitä näytesarjan varsinaisten näytteiden väleihin, ottamalla carry over huomioon näytesarjaa laadittaessa tai käyttämällä riittävästi erityyppisiä neulan ja injektorin pesuja injektointien väleissä.

Carry over -efektiä tutkittiin injektoimalla blank-näyte suurimman kalibrointi-standardin jälkeen. Carry overin osuus laskettiin vertaamalla blank-näytteen piikin pinta-alaa suurimman kalibrointistandardin piikin pinta-alaan. Kuvassa 18 on esitetty suurimman kalibrointistandardin jälkeen injektoidun blank-näytteen kromatogrammi.



Kuva 18. Suurimman standardin jälkeen injektoidun blank-näytteen kromatogrammi



Blank-näytteen piikin pinta-ala oli 40 000 cps ja ST 250 piikin pinta-ala oli 22 000 000 cps. Carry overin prosenttiosuus on tällöin:

$$\left( \frac{40\,000}{22\,000\,000} \right) * 100 \% = 0.2 \% .$$

Edellä saadun tuloksen perusteella voidaan todeta analyytin aiheuttaman carry overin olevan hyvin pieni.

#### 5.2.4 Määritysalaraja

Määritysraja tarkoittaa alinta pitoisuutta, joka voidaan määrittää riittävän tarkasti ja toistettavasti. Määritysalaraja on tavallisesti sama kuin kalibrointisuoran pienin pitoisuus. Kromatografisissa menetelmissä määritysrajan arvioinnissa käytetään tavallisesti signaali-kohinasuhdetta 10:1. [9, s. 30; 10, s. 70.]

Opinnäytetyössä kehitetyllä menetelmällä analysoitiin näytteitä, joista joidenkin pitoisuuksien ennustettiin olevan hyvin pieniä. Tämän vuoksi kvantitointialarajaksi pyrittiin saamaan 0,100 ng/ml. Määritysalarajan tarkkuutta ja toistettavuutta tutkittiin laskemalla testisarjan neljälle rinnakkaiselle QC-näytteelle kalibroitikuvaajan avulla suhteellinen keskihajonta (RSD%), joka kuvaa mittauksen toistettavuutta ja virhe (bias%), joka kuvaa sen oikeellisuutta. Kvantitointialarajaksi voidaan asettaa sellainen pitoisuus, jolle lasketut RSD%- ja bias%-arvot ovat  $\pm 30\%$ . Suhteellinen keskihajonta voidaan laskea kaavan 1 avulla.

Oikeellisuus voidaan laskea kaavasta 2:

$$bias\% = \left( \frac{x_i - X}{X} \right) * 100 \% \quad (2)$$

jossa

$x_i$  = yksittäinen mittaustulos

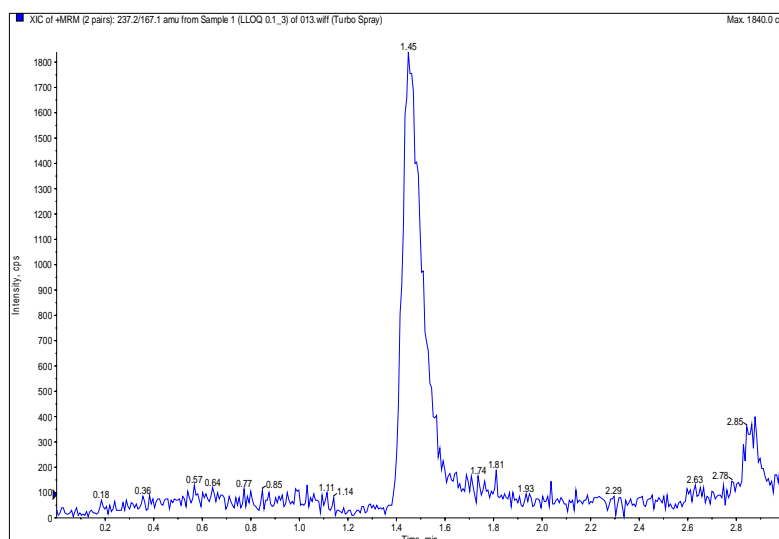
$X$  = mittauksen odotusarvo

Taulukossa 17 on esitetty lasketut tulokset.

*Taulukko 17. Toistomittausten tulokset ja niistä lasketut oikeellisuus ja toistettavuus määritysalarajalla*

Todellinen pitoisuus (ng/ml)	0,100
Näyte 1 (ng/ml)	0,0873
Näyte 2 (ng/ml)	0,0900
Näyte 3 (ng/ml)	0,0975
Näyte 4 (ng/ml)	0,0912
Keskiarvo (ng/ml)	0,0915
RSD (%)	4,7
Bias (%)	-8,5

Kuten taulukosta 17 nähdään, mittauksen oikeellisuus menetelmällä pitoisuudelle 0,100 ng/ml oli -8,5 % ja toistettavuus 4,7 %. Menetelmän määrittysalarajaksi voitiin asettaa 0,100 ng/ml. Kuvassa 19 on esitetty määritysalarajan kromatogrammi.



*Kuva 19. Kvantitointialaraja 0,100 ng/ml*

Kuten kuvasta 19 nähdään, analyytin signaali määritysalarajalla eroaa taustakohinasta erittäin hyvin ja signaali-kohinasuhde on noin 1:20.

#### 5.2.5 Menetelmän oikeellisuus ja toistettavuus

Oikeellisuus kuvaa sitä, kuinka hyvin mittaustulos vastaa teoreettista oikeaa arvoa ja se ilmaistaan usein prosenttipoikkeamana oikeasta arvosta [4, s. 29].

Toistettavuudella tarkoitetaan menetelmän täsmällisyyttä, kun mittaukset tehdään samoissa olosuhteissa lyhyellä aikavälillä. Toistettavuus voidaan jakaa mittaustuloksen toistuvuuteen ja toistuvuusolosuhteisiin. Mittaustuloksen toistuvuudella tarkoitetaan samoissa mittaolosuhteissa peräkkäisten mittaustulosten paikkaansa pitävyyttä. Toistuvuusolosuhteilla mittaukset tekee sama henkilö samassa laboratoriossa samaa laitteistoa ja menetelmää käyttäen. [9, s. 37.]

Koska yksittäinen mitta on vain suuntaa antava arvio näytteen pitoisuudesta, menetelmän oikeellisuutta ja toistettavuutta arvioitaessa vaaditaan useita toistomittauksia. Tällöin päästään lähemmäksi oikeaa arvoa. Edellä mainitut menetelmän suorituskykyä ilmaisevat parametrit voidaan määrittää spiikkaamalla näytematriisiin tarkka, tunnettu määrä analyyyttiä esimerkiksi kolmella pitoisuustasolla ja suorittamalla niistä useita rinnakkaismäärittäyksiä. Näytesarjan sisäinen vaihtelu on usein pienempää kuin näytesarjojen välinen vaihtelu, joka ei saisi erota merkittävästi sarjan sisäisestä vaihtelusta. [9, s. 37; 10, s. 68, 76–77.]

Menetelmän oikeellisuutta ja toistettavuutta tutkittiin QC-näytteiden avulla sekä ennen sen käyttöönottoa että sitä käytettäessä. Toistettavuutta tutkittiin mittaustuloksen toistuvuuden sekä toistuvuusolosuhteiden avulla. Menetelmän oikeellisuutta kuvaa mittaustuloksista laskettu bias% ja toistettavuutta RSD%, jotka saavat olla maksimissaan 30 %.

Taulukossa 18 on esitetty neljän rinnakkaisen QC-näytteen samana päivänä mitatut arvot kolmella eri pitoisuudella ja niistä kalibrointikuvaajan sekä kaavojen 2 avulla laskettu oikeellisuus (Bias%) ja kaavan 1 avulla laskettu mittaustuloksen toistuvuus (RSD%) .

*Taulukko 18. Menetelmän oikeellisuus ja mittaustuloksen toistuvuus samana päivänä*

Todellinen pitoisuus (ng/ml)	0,400	8,00	200
Näyte 1 (ng/ml)	0,405	7,28	163
Näyte 2 (ng/ml)	0,461	7,96	194
Näyte 3 (ng/ml)	0,446	8,24	179
Näyte 4 (ng/ml)	0,437	8,35	179
Keskiarvo (ng/ml)	0,437	7,96	179
Bias (%)	9,3	-0,53	-11
RSD (%)	5,4	6,0	7,1

Kuten taulukon 18 tuloksista nähdään, oikeellisuus on välillä -0,53–11 % ja mittaustuloksen toistuvuus välillä 5,4–7,1 %. Sekä oikeellisuus että mittaustuloksen toistuvuus samana päivänä ovat annettujen rajojen sisällä.

Taulukossa 19 on esitetty kahden rinnakkaisen QC-näytteen mitatut arvot kolmella eri pitoisuudella sekä niistä kaavan 2 avulla lasketut oikeellisuutta kuvaavat arvot (Bias%) ja kaavan 1 avulla lasketut toistuvuusolosuhteet (RSD%). Mittaukset suoritettiin kolmena eri päivänä varsinaisten tutkimusnäytteiden kanssa.

*Taulukko 19. Menetelmän oikeellisuus ja toistuvuusolosuhteet lyhyellä aikavälillä*

Todellinen pitoisuus (ng/ml)	0,400	8,00	200
Päivä 1 (ng/ml)	0,435	7,55	168
	0,429	-	170
Päivä 2 (ng/ml)	0,385	7,76	-
	0,444	9,30	192
Päivä 3 (ng/ml)	0,412	7,95	170
	0,383	7,72	168
Keskiarvo (ng/ml)	0,415	8,06	173
Bias (%)	3,7	0,7	-13
RSD (%)	6,3	8,8	6,0

Kuten taulukosta 19 nähdään, menetelmän oikeellisuus on välillä -13–0,7 %. Toistettavuus eri päivinä on välillä 6,0–8,8 %. Yhteenvedona voidaan todeta, että menetelmä on toistettava ja tulokset ovat oikeellisia sekä samana päivänä että lyhyellä aikavälillä.

#### 5.2.6 Analyytin säilyvyys

Analyytin säilymistä kantaliuoksessa voidaan tutkia vertaamalla tuoretta ja säilytettyä kantaliuosta toisiinsa. Kantaliuoksista valmistetaan sopivat laimennokset ajoliuokseen ja niiden vasteita verrataan toisiinsa. Vasteiden eron tulisi olla alle 10 %.

Kantaliuoksen säilyvyyttä asetonitrilissä tutkittiin siten, että tutkittavasta analyytistä valmistettiin eri päivinä kantaliuoksia (100 µg/ml), joita verrattiin aiemmin valmistettuihin kantaliuoksiin. Eri päivinä valmistetuista kantaliuoksista laimennettiin ajoliuokseen neljä rinnakkaista näytettä, joiden kaikkien pitoisuus oli 0,100 ng/ml. Rinnakkaisten näytteiden piikkien pinta-alojen keskiarvoja verrattiin keskenään olettaen, että uusimmasta kantaliuoksesta valmistettujen näytteiden piikkien pinta-alan keskiarvo on 100 %.

Taulukossa 20 on esitetty mittaustulokset sekä niistä lasketut keskiarvot ja muutokset alkutilanteeseen.

*Taulukko 20. Kantaliuoksen säilyvyyskokeiden mittaustulokset pinta-aloina (cps)*

Kantaliuoksen ikä (vrk)	0	9	15
Näyte 1 (cps)	61 600	48 300	37 600
Näyte 2 (cps)	67 200	51 600	41 400
Näyte 3 (cps)	66 600	50 800	42 800
Näyte 4 (cps)	67 500	50 100	43 200
Keskiarvo (cps)	65 725	50 200	41 250
Muutos alkutilanteesta (%)	–	-23,6	-37,2

Kuten taulukosta 20 nähdään, analyytti ei säily asetonitrilissä. Tästä johtuen jouduttiin varsinaisen tutkimuksen aikana valmistamaan useita kantaliuoksia. Huonon säilyvyyden mahdollisia syitä ovat esimerkiksi analyytin tarttuminen säilytysastian sisäpintaan tai sen hajoaminen.

Lyhytaikaisen säilyvyyden tutkiminen loppuliuottimessa on tärkeää varsinkin silloin, jos näytesarja on pitkä. Tällöin on tärkeää, että tutkittava analyytti ei hajoa loppuliuottimessa, koska tällöin näytesarjan lopussa injektoidujen näytteiden mitatut pitoisuudet ovat todellista pitoisuutta pienemmät. Lyhytaikaista säilyvyyttä loppuliuottimessa tutkitaan siten, että kalibrointinäytteitä injektoidaan testinäytesarjan alussa ja lopussa samasta näyteastiasta ja verrataan niistä saatujen ensimmäisen ja toisen suoran intensiteettien eroja. Kuvasta 15 voidaan nähdä, että testisarjan alussa ja lopussa injektoidujen saman pitoisuuden kalibrointinäytteiden lasketut pitoisuudet ovat lähes samat. Tästä voidaan päätellä, että tutkittava analyytti säilyy loppuliuottimessa ainakin testinäytesarjan ajan ajan, eli useita tunteja.

### 5.2.7 Saanto

Saannolla tarkoitetaan analyysimenetelmän tehoa erottaa tutkittava analyytti näytematriisista [9, s. 32]. Saannon tutkiminen on tärkeää, sillä se antaa olennaista tietoa näytteenkäsittelystä. Näytteenkäsittelyssä uuttuvat näytematriisista peräisin olevat komponentit voivat vaikuttaa laitteiston mittaamaan vasteeseen. Analyytin saanto määritetään tavallisesti siten, että spii-kattujen, uuttoprosessin läpikäyneiden näytteiden (pre-spiked) vasteita verrataan näytteisiin, joihin analyytti lisätään vasta uuttoprosessin jälkeen (post-spiked). Saantoprosentti määritetään tavallisesti vähintään kolmella eri pitoisuudella ja riittävällä määrällä rinnakkaisnäytteitä. [10, s. 72–73; 1, s. 63.]

Saanto voidaan laskea kaavasta 3:

$$\text{Saanto (\%)} \quad R = \left[ \frac{A_1}{A_2} \right] * 100 \% \quad (3)$$

jossa

$A_1$  = rinnakkaisten saantokoenäytteiden (pre-spiked) piikkien pinta-alojen (cps) keskiarvo

$A_2$  = rinnakkaisten saantoverailunäytteiden (post-spiked) piikkien pinta-alojen (cps) keskiarvo

Taulukossa 21 on mittaustuloksista kaavan 3 avulla lasketut keskimääräiset saantoprosentit kolmella eri pitoisuustasolla.

*Taulukko 21. Lasketut saantoprosentit (R%) pitoisuuksilla 0,400, 8,00 ja 200 ng/ml*

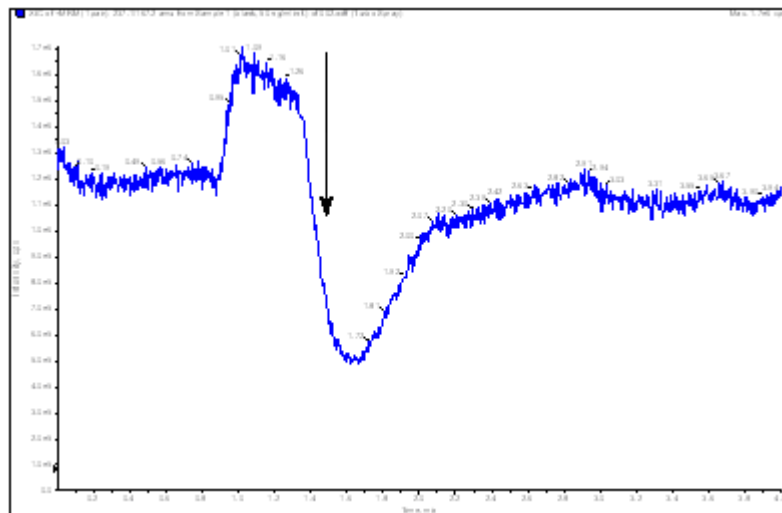
Pitoisuus (ng/ml)	0,400	8,00	200
R (%)	90	88	93
n	6	6	6

Kuten taulukosta 21 nähdään, saantoprosentit analyyttille ovat välillä 88,0–93,0 kolmella eri pitoisuudella. Tästä voidaan päätellä, että uuttoprosessi on kaiken kaikkiaan hyvin onnistunut. Näytteenkäsittelystä ei myöskään aiheudu juuri lainkaan näytehävikkiä. Lisäksi analyytti uuttuu kaikilla testatuilla pitoisuuksilla samassa suhteessa, jolloin kalibrointikuvaajan kaartuminen pitoisuuden kasvaessa ei johtune uuttoprosessista vaan laitteistosta. Suurilla pitoisuuksilla ei laitteiston detektori luultavasti pysty mittaamaan kaikkia sinne saapuvia ioneja.

#### 5.2.8 Matriisiefekti

ESI-ionisaatiossa matriisiefektin ilmentyminen on mahdollista, mikäli jokin näytematriisista uuttuva komponentti kilpailee analyytin kanssa ionisoitumisessa. Matriisiefektiä pyritään ehkäisemään näytteen riittävällä puhdistamisella biologisesta matriisista, uuttoliuotINVALINNALLA sekä kromatografiaa kehittämällä. [1, s. 211.]

Matriisiefektiä tutkittiin siten, että massaspektrometrille syötettiin ajoliuokseen (NH<sub>4</sub>OAc:ACN 20:80) laimennettua analyyttiä (50 ng/ml) nopeudella 20 µl/min ja injektointiin samanaikaisesti nestekromatografian kautta blanknäytettä. Kuvassa 19 on esitetty kyseisen kokeen kromatogrammi.



Kuva 20. Matriisiefektikokeen kromatogrammi

Kuten kuvasta 19 nähdään, matriisiefekti ilmenee ennen analyytin retentioaikaa signaalin vahvistumisena ja analyytin retentioajalla (1,4 minuuttia) signaalin heikentymisenä. Matriisiefektin suuruutta ei määritetty, sillä matriisiefekti ei vaikuttanut tulosten toistettavuuden perusteella millään tavalla kehitettyyn menetelmään.

## 6 YHTEENVETO JA LOPPUPÄÄTELMÄT

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli kehittää kvantitatiivinen LC-MS/MS-menetelmä eräälle discovery-vaiheen lääkeainekandidaatille sekä testata kehitetyn menetelmän toimivuutta.

Tutkittava analyytti eristettiin hiiren plasmasta käyttäen neste-neste-uuttoa. Kvadrupolimassa-analysaattorin ja nestekromatografian asetukset optimoitiin siten, että tutkittava yhdiste eluotui riittävän nopeasti ja siitä saatavan piikin muoto oli kapea ja intensiteetti suuri.

Menetelmää testattiin Orion Pharman sisäisen SOP-toimintaohjeen edellyttämällä tavalla. Testatut parametrit olivat spesifisyys ja selektiivisyys, kalibrointi, tarkkuus, toistettavuus ja tutkittavan analyytin säilyvyys. Tässä opinnäytetyössä tutkittiin SOP-toimintaohjeesta poiketen myös saanto ja mat-

riisiefekti, jotka antavat olennaista tietoa erityisesti näytteenkäsittelymenetelmän toimivuudesta.

Kehitetty menetelmä oli selektiivinen ja spesifinen käytetyn HPLC-MS/MS-tekniikan ansiosta. Vaikka kalibroitikuvaaja kaartui konsentraation kasvaessa, täyttivät kalibroinnin oikeellisuus ja toistettavuus annetut kriteerit. Määritetty carry over oli erittäin pieni, mikä lisää menetelmällä saatujen tulosten oikeellisuutta ja helpottaa menetelmän käyttöä erityisesti pienillä pitoisuuksilla työskenneltäessä. Määritysalarajaksi voitiin asettaa 0,100 ng/ml, sillä kyseinen pitoisuus voitiin määrittää menetelmällä riittävän tarkasti ja toistettavasti. Menetelmän testauksessa tulosten oikeellisuutta ja toistettavuutta tutkittiin myös sekä samana päivänä että eri päivinä. Menetelmän oikeellisuudessa tai toistettavuudessa ei havaittu olevan suuria eroja päivien sisällä tai niiden välillä.

Analyytin havaittiin säilyvän riittävän kauan ajoliuoksessa, mistä on hyötyä erityisesti pitkissä näytesarjoissa. Asetonitriliikantaliuoksessa analyytti ei tulosten mukaan säily, joten kalibroitistandardit ja QC-näytteet on valmistettava aina tuoreesta kantaliuoksesta. Tämän opinnäytetyön jälkeen tehdyissä tutkimuksissa on havaittu, että tutkittava analyytti hapettuu asetonitrilissä. Menetelmää on kehitetty siten, että kyseistä hapettumistuotetta seurataan kalibroitistandardeista, QC-näytteistä sekä tutkimusnäytteistä tutkittavan analyytin lisäksi. Jatkotutkimuksissa havaittiin analyytin säilyvän metanolissa.

Näytteenkäsittelymenetelmän kehitys onnistui hyvin, sillä analyytille saatiin kohtalaisen suuri saanto koko kalibrointialueella eikä näytematriisista uuttunut analyysiä häiritseviä yhdisteitä. Matriisiefektiä tutkittaessa havaittiin, että analyytin retentioajalla eluoituu jokin luultavasti plasmamatriisista peräisin oleva yhdiste, joka heikentää tutkittavan yhdisteen signaalia. Matriisiefekti ei kuitenkaan vaikuttanut tulosten oikeellisuuteen tai menetelmän toistettavuuteen.

Menetelmä on tällä hetkellä käytössä Orion Pharman bioanalytiikan laboratoriossa. Menetelmällä on mitattu tutkittavan analyytin pitoisuuksia sekä plasmassa että kudoksenäytteissä.



## VIITELUETTELO

- [1] Wells, David, A., *High Throughput Bioanalytical Sample Preparation. Methods and Automation Strategies*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science b.v. 2003.
- [2] Jaarinen, Soili - Niiranen, Jukka, *Laboration analyysitekniikka*. Helsinki: Edita. 5. uud. painos. 2005 (1996).
- [3] Tapaninaho, Susanna, *TNT:n ja RDX:n määrittäminen HPLC:lla ja menetelmän validointi*. [verkkodokumentti, viitattu 19.10.2010]. Saatavissa: [https://jyx.jyu.fi/dspace/bitstream/handle/123456789/22769/URN\\_NBN\\_fi\\_jyu-201001251075.pdf?sequence=1](https://jyx.jyu.fi/dspace/bitstream/handle/123456789/22769/URN_NBN_fi_jyu-201001251075.pdf?sequence=1).
- [4] Laurikainen, Anssi, *Bentsoe-, salisyyli- ja sorbiinihapon määrittäminen alkoholi-näytteestä nestekromatografisesti - menetelmän kehitys ja validointi*. Opin-näytetyö. Helsingin ammattikorkeakoulu. Helsinki. 2008.
- [5] Laine, Aleks, *Polaaristen yhdisteiden analytiikkaan soveltuvat nestekroma-tografia-massaspektrometria-menetelmät*. [verkkodokumentti, viitattu 5.9.2010]. Saatavissa: [https://jyx.jyu.fi/dspace/bitstream/handle/123456789/19967/URN\\_NBN\\_fi\\_jyu-200904201471.pdf?sequenc](https://jyx.jyu.fi/dspace/bitstream/handle/123456789/19967/URN_NBN_fi_jyu-200904201471.pdf?sequenc).
- [6] *Massaspektrometrian perusteet*, Toim. Raimo Ketola ym. Helsinki: Haka-paino. 2010.
- [7] Mitrovich, Sam - Sheehan, Ed - Willoughby, Ross, *A Global View of LC/MS*. Pittsburgh, Pennsylvania: Global View Publishing. 1998.
- [8] Bristol.com, *HPLC/MS*. [verkkodokumentti, viitattu 7.9.2010]. Saatavissa: <http://www.bristol.ac.uk/nerclmsf/techniques/hplcms.html>.
- [9] *Kemian metrologian opas*, Toim. Tapio Ehder. Helsinki: MIKES. 2005.
- [10] Duncan, Mark, W. – Gale, Jane, P. – Yergey, Alferd, L., *The Principles of Quantative Mass Spectrometry*. Denver, Colorado: Rockpool Productions LLC. 2006.